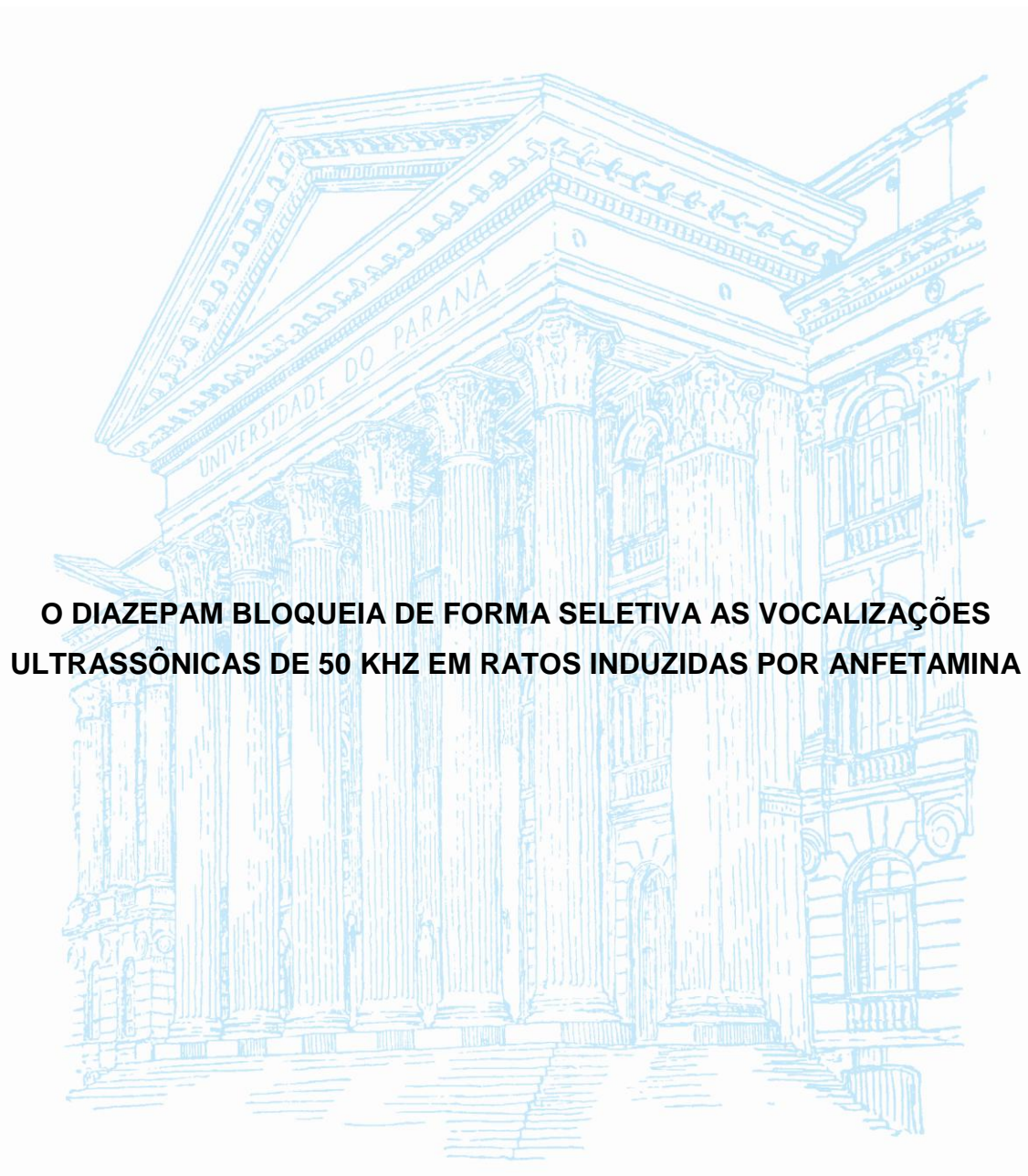


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISELE DE OLIVEIRA GUAITA



**O DIAZEPAM BLOQUEIA DE FORMA SELETIVA AS VOCALIZAÇÕES  
ULTRASSÔNICAS DE 50 KHZ EM RATOS INDUZIDAS POR ANFETAMINA**

CURITIBA

2017

GISELE DE OLIVEIRA GUAITA

**O DIAZEPAM BLOQUEIA DE FORMA SELETIVA AS VOCALIZAÇÕES  
ULTRASSÔNICAS DE 50 KHZ EM RATOS INDUZIDAS POR ANFETAMINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia,  
no Curso de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

CURITIBA

2017



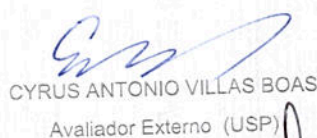
## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

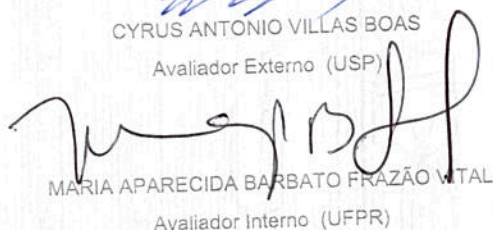
No dia vinte e oito de Março de dois mil e dezessete às 14:00 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Anexo I do Setor de Ciências Biológicas - Farmacologia, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **GISELE DE OLIVEIRA GUAITA** para a Defesa Pública de sua dissertação intitulada **O ANSIOLÍTICO DIAZEPAM BLOQUEIA DE FORMA SELETIVA OS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA ANFETAMINA**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: CLAUDIO DA CUNHA (UFPR), CYRUS ANTONIO VILLAS BOAS (USP), MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, CLAUDIO DA CUNHA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 28 de Março de 2017.

  
CLAUDIO DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
CYRUS ANTONIO VILLAS BOAS  
Avaliador Externo (USP)

  
MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL  
Avaliador Interno (UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de GISELE DE OLIVEIRA GUAITA intitulada: **O ANSIOLÍTICO DIAZEPAM BLOQUEIA DE FORMA SELETIVA OS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA ANFETAMINA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 28 de Março de 2017.

  
CLAUDIO DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
CYRUS ANTONIO VILLAS BOAS

Avaliador Externo (USP)

  
MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL

Avaliador Interno (UFPR)

Dedicado a minha filha Brenda e aos  
meus pais Reinaldo e Alveni

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus que sempre esteve ao meu lado ;

À minha filha Brenda que é a minha razão de viver;

Aos meus pais Reinaldo e Alveni, pelo amor e dedicação que sempre me deram e principalmente por sempre cuidarem da minha pequena quando eu estava ausente;

Ao meu orientador Prof. Dr Cláudio da Cunha, um dos neurocientistas mais dedicados que conheço, agradeço pela oportunidade e por todo o ensinamento adquirido;

Ao anjo chamado Silvia Nardi Cordazzo (Silvinha) que Deus colocou no meu caminho, agradeço pela ajuda e principalmente pelos conselhos quando eu achava que não seria possível...

A minha amigona Patricia Pott, agradeço por ter me ajudado muito nessa caminhada e que está fazendo muita falta na Farmacologia.

A minha super amiga Ely Rodrigues de Oliveira, agradeço pelas palavras de incentivo quando eu chegava estressada na secretaria para tomar um cafézinho.

A Nair Lugo nossa “Pereirão”, agradeço por sempre ter me ajudado nos consertos dos aparelhos quando estava tudo desmontado.

A Gabriela, amiga de pouco tempo, agradeço pelo apoio.

Ao Dr Maurício Scussel agradeço por ter sido meu coorientador no meu primeiro trabalho o qual infelizmente por falta de verba, não foi possível concluir.

Aos colegas de laboratório: Alex, Amanda, Suelen e Julie agradeço pela ajuda no segundo trabalho o qual também devido a vários imprevistos não foi possível realizar.

Ao Prof. Dr Roberto Andreatini e aos seus alunos Débora Dalavechia, Luiz Kae Sales Kanazawa e Inara Fernanda Misiuta Raupp, agradeço pela grande colaboração para a realização desse trabalho.

A prof Dra Maria Vital exemplo de professora e de mulher a qual admiro muito agradeço pelos conselhos e ajuda.

Ao Departamento de Farmacologia da UFPR pelo apoio e incentivo.

## **Eu cuido de ti**

Quando todos os meus medos  
já não cabem mais em mim  
Quando o céu está de bronze e parece que é o fim  
Quando o vento está revoltado  
e o mar não quer se acalmar  
Quando as horas do relógio se demoram a passar  
Muitas vezes os seus planos não consigo entender  
Mas prefiro confiar sem compreender

Eu creio em ti  
Eu creio em ti  
Eu olho pra ti  
E espero em ti

Quando você sente medo, do teu lado eu estou  
E é bom que você saiba que eu sinto a tua dor  
Nunca, nunca se esqueça que o mar posso acalmar  
E que eu sei o tempo certo da vitória te entregar  
Este tempo é necessário pra te amadurecer  
E depois tem novidade pra você

Eu cuido de ti  
Eu cuido de ti  
Descansa em mim  
Comece a sorrir

O que eu tenho é bem melhor  
Pois só eu sei do amanhã  
Então recebe o abraço meu,  
pois da tua vida cuido eu

AMANDA WANESSA  
Canção e Louvor



## RESUMO

Ao contrário do que fazem a maioria das drogas de abuso, o benzodiazepínico diazepam diminui a liberação de dopamina no núcleo accumbens e bloqueia o aumento na liberação de dopamina induzida por anfetamina. O objetivo desse trabalho foi testar se existe também um antagonismo entre o diazepam e a anfetamina quanto aos seus efeitos comportamentais. Ratos Wistar e camundongos Swiss adultos machos receberam uma injeção i.p. de veículo (solução salina), anfetamina (3 mg/kg), diazepam (2 mg/kg), haloperidol (0.2 mg/kg) ou uma combinação dessas drogas. Testamos o efeito desses tratamentos sobre respostas a drogas gratificantes, vocalizações ultrasônicas de alta frequência (USV), psicoestimulantes (atividade locomotora) e ansiolíticas (testes do labirinto em cruz elevado e teste de esconder esferas). A anfetamina causou um aumento das USV e um aumento da atividade locomotora. O diazepam causou um efeito ansiolítico e não afetou as USV e a maioria dos escores de ambulação. Além disso, o diazepam bloqueou de forma seletiva os efeitos da anfetamina sobre as USV, mas não sobre a atividade locomotora. Por outro lado, o antagonista dopaminérgico haloperidol bloqueou de forma não-seletiva os efeitos da anfetamina sobre as USV e a atividade locomotora. Esses resultados sugerem que o efeito gratificante das anfetaminas pode ser bloqueado de forma seletiva pelos benzodiazepínicos. Isso faz dos benzodiazepínicos, medicamentos para o tratamento do abuso de drogas.

**Palavras-chave:** diazepam, anfetamina, dopamina, dependência, drogas de abuso, ansiedade, psicoestimulantes.



## ABSTRACT

Unlike most drugs of abuse, the benzodiazepine diazepam decreases the release of dopamine in the nucleus accumbens and blocks the increase in amphetamine-induced release of dopamine. The objective of this study was to test whether there is also an antagonism between diazepam and amphetamine for its behavioral effects. Male adult Wistar rats and Swiss mice received injection i.p. of vehicle (saline), amphetamine (3 mg/kg), diazepam (2 mg/kg), haloperidol (0.2 mg/kg) or a combination of these drugs. We tested the effect of these treatments on responses to rewarding drugs (ultrasonic high frequency vocalizations, USV), psychostimulants (locomotor activity) and anxiolytics (elevated plus maze test and marble burying test). Amphetamine caused an increase in USV and an increase in locomotor activity. Diazepam caused an anxiolytic effect and did not affect the USV and most of the ambulation scores. In addition, diazepam selectively blocked the effects of amphetamine on USV, but not on locomotor activity. The dopaminergic antagonist haloperidol blocked non-selectively the effects of amphetamine on the USV and locomotor activity. These results suggest that the reinforcing effect of amphetamines can be selectively blocked by the benzodiazepines. This makes the benzodiazepines candidates for drugs for the treatment of drug abuse.

**Key words:** diazepam, amphetamine, dopamine, addiction, drugs of abuse, anxiety, psychostimulants.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Principais vias dopaminérgicas no cérebro.....	02
FIGURA 2 – Representação esquemática do mecanismo de ação das anfetaminas.....	05
FIGURA 3 – Representação esquemática do mecanismo de ação dos benzodiazepínicos.....	06
FIGURA 4 – Representação das categorias de vocalizações de 50 kHz.....	10
FIGURA 5 – Representação do procedimento para a gravação e análise das vocalizações .....	10
FIGURA 6 – Representação dos parâmetros de uma vocalização de frequência modulada.....	11
FIGURA 7 – Caixa de movimentação.....	12
FIGURA 8 – Labirinto em cruz elevado.....	14
FIGURA 9 – Teste de esconder esferas.....	15
FIGURA 10 – Número de vocalizações de 50 kHz.....	20
FIGURA 11 – Histograma dos tipos de vocalizações de 50 kHz.....	22
FIGURA 12 – Atividade locomotora.....	24
FIGURA 13 – Escore de ansiedade no labirinto em cruz elevado.....	26
FIGURA 14 – Escore de ansiedade no teste de esconder esferas.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF	- Anfetamina
BZD	- Benzodiazepínico
CPP	- Preferência condicionada de lugar
DA	- Dopamina
DZP	- Diazepam
GABA	- Ácido $\gamma$ - aminobutírico
HALO	- Haloperidol
LCE	- Labirinto em cruz elevado
NAc	- Núcleo accumbens
SNC	- Sistema nervoso central
USV	- Vocalização ultrassônica
UNODC	- United Nations Office on Drugs and Crime

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1	SISTEMA DOPAMINÉRGICO .....	01
1.2	ANFETAMINA .....	03
1.3	BENZODIAZEPÍNICOS .....	05
1.3.1	Drogas de abuso e benzodiazepínicos.....	07
1.3.2	Diazepam .....	07
1.4	VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS.....	08
1.5	CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO .....	12
1.6	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	13
1.7	TESTE DE ESCONDER ESFERAS .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1	ANIMAIS.....	16
3.2	TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS .....	17
3.3	VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS.....	17
3.4	ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	17
3.5	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	18
3.6	TESTE DE ESCONDER ESFERAS .....	18
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
4.1	VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS.....	19
4.2	ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	23
4.3	ESCORES DE ANSIEDADE NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....	25
4.4	ESCORES DE ANSIEDADE NO TESTE DE ESCONDER ESFERAS.....	27
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dependência de drogas de abuso apresenta um grande impacto na saúde e apesar de ser um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, o consumo de drogas só tem aumentado. De acordo com dados do Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crime (UNODC), 3% da população mundial consumiram drogas em 2013 e deste total mundial, as anfetaminas do tipo estimulantes foram consumidas por 38 milhões de pessoas. O relatório de 2016 relatou que este índice aumentou para cerca de 5% em 2014. O consumo de anfetaminas no Brasil, em 2011 apresentou os níveis mais altos da América do Sul. Junto com Venezuela e Argentina, o Brasil teve os maiores números absolutos de usuários das substâncias. Na média, entre 1,34 e 1,89 milhões de sulamericanos com idade entre 15 e 64 anos já usaram anfetaminas, e 13,8% de universitários brasileiros com idade entre 18 e 35 anos declararam ter usado anfetamina em algum momento da vida. Entre os universitários, os maiores consumidores têm 35 anos de idade: 23,6% dessas pessoas consumiram anfetamina pelo menos uma vez na vida, 18,6% fazem isso anualmente e 16,5%, mensalmente (UNODC). O entendimento das bases neurológicas da dependência de drogas de abuso tem sido um grande desafio para clínicos e pesquisadores.

### 1.1 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

O sistema dopaminérgico apresenta um papel bastante importante nas propriedades reforçadoras das drogas de abuso (Koob, 1992). O neurotransmissor dopamina (3,4-dihidroxifeniletanamina; DA), é uma amina biogênica do grupo das catecolaminas (Tritsch e Sabatini, 2012). A dopamina tem um papel importante na modulação de funções motora, motivação, recompensa, reforço, cognição e memória (Da Cunha, 2012).

A síntese da DA tem como precursor o aminoácido tirosina. A tirosina é convertida em L-3,4-diidroxifenilalanina (levodopa, L-DOPA) por ação da enzima tirosina-hidroxilase. A L-DOPA é convertida em DA por ação da enzima DOPA descarboxilase. Uma vez sintetizada, a DA é transportada para vesículas sinápticas pela proteína transportadora de catecolaminas (VMAT) (Kolb e Whishaw, 2007). Quando os terminais sinápticos dos neurônios dopaminérgicos são despolarizados a

DA é liberada por exocitose e se liga a receptores específicos, tanto pré- quanto pós-sinápticos (Tritsch e Sabatini, 2012). A DA liberada pode ser degradada pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) assim como pela enzima monoamina-oxidase (MAO) extracelular ou ser transportada de volta para o terminal sináptico pela ação do transportador de DA (DAT) onde é armazenada em vesículas sináptica ou degradada pela ação da MAO intracelular. Além disso, uma parte da DA liberada se difunde, podendo atuar em receptores que estão fora da sinapse (Standaert e Galanter, 2012; Bjorklund e Dunnett, 2007).

Os receptores dopaminérgicos são do tipo metabotrópicos (acoplado à proteína G) e fazem parte de duas famílias: D1 e D2. A ligação da DA a receptores da família D1 (formada por receptores D1 e D5), leva ao aumento do AMP cíclico (AMPc), o que resulta na ativação da proteína quinase A (PKA). O contrário ocorre quando a DA se liga com receptores da família D2 (formada por receptores D2, D3 e D4). Estes receptores estão acoplados a proteína Gi e G0 e a sua ativação resulta na diminuição da concentração de AMPc. A PKA fosforila canais iônicos de potássio (K<sup>+</sup>) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>) voltagem-dependentes, alterando o potencial de membrana resultando em uma maior ou menor probabilidade de que a liberação de glutamato despolarize o neurônio pós-sináptico (Kolb e Whishaw, 2007).

Os neurônios dopaminérgicos se projetam por quatro vias principais no SNC: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e tubero infundibular (fig.1)

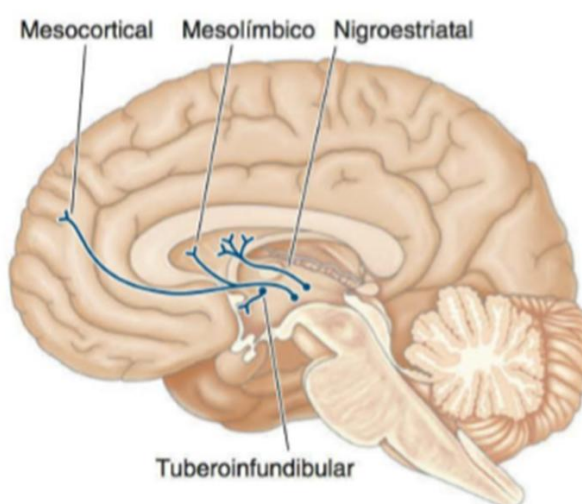


Figura 1- Principais vias dopaminérgicas no cérebro (Goodman e Gilman, 2012).

A via mesocortical é importante para as funções cognitivas incluindo motivação, recompensa, emoção e controle de impulsos. Está implicada em psicoses, incluindo esquizofrenia e no distúrbio de hiperatividade e déficit de atenção. A via nigroestriatal é um regulador-chave do movimento, comprometimentos desta via ocorrem na doença de Parkinson. A DA liberada na via tuberoinfundibular é transportada até a hipófise onde regula a secreção de prolactina. A via mesolímbica é também chamada de “sistema de recompensa” e é formada por neurônios da área tegmentar ventral (VTA) com projeções dopaminérgicas para o núcleo accumbens (NAc). Ela desempenha um papel bastante importante na dependência de drogas de abuso e está mais associada a recompensa e menos com os comportamentos aprendidos (Wise e Rompre, 1989). Disfunções nesta via estão associadas a dependência (adição), esquizofrenia e psicoses (incluindo a depressão bipolar) e déficit de aprendizado (Kolb e Whishaw, 2007; Imperato e Di Chiara 1986; Wise e Rompre, 1989).

O aumento na liberação de DA no NAc é um dos principais mecanismos dos efeitos reforçadores da maioria das drogas de abuso (Pierce e Kumaresan, 2006).

## 1.2 ANFETAMINA

As anfetaminas (ANF) são drogas psicoestimulantes com um alto potencial de abuso. Elas atuam aumentando os níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina no cérebro (Fleckenstein et al., 2007; Di Chiara e Imperato, 1988; Sulzer, 2011). Agem diretamente na via dopaminérgica mesolímbica (Meririnne et al., 1999; Bressan e Pilowskv, 2003).

A anfetamina promove um aumento na concentração extracelular de dopamina e outras monoaminas por vários mecanismos. Ela atua bloqueando o transportador da dopamina (DAT), o transportador da noradrenalina (NET) e, em menor nível, ela também bloqueia o transportador da serotonina (SERT). A anfetamina também compete com os neurotransmissores monoaminérgicos quando eles são transportados por essas proteínas. Após ser transportada para dentro do terminal pré-sináptico a anfetamina inibe o transportador de monoaminas vesicular do tipo 2 (VMAT2) e promove a liberação das monoaminas para a fenda sináptica (Robertson et al., 2009).



Farmacologicamente as anfetaminas são classificadas como agonistas de ação indireta, pois não atuam especificamente sobre receptores monoaminérgicos pós-sinápticos mas, agem indiretamente: impedindo a recaptação dos neurotransmissores através do bloqueio competitivo do transportador de dopamina (fig.2) e noradrenalina e em altas doses, também de serotonina; inibindo a atividade das enzimas monoamino oxidase (MAO) e estimulando a liberação do neurotransmissor independente de  $Ca^{++}$  (ou seja independente da despolarização do botão sináptico) (Fleckenstein et al., 2007).

Nos animais a anfetamina causa aumento do estado de alerta, da atividade locomotora e também da agressividade. Com o uso de grandes doses de anfetamina ocorrem comportamentos estereotipados, que consiste em ações repetidas, tais como lambar, roer, levantar nas patas traseiras ou movimentos repetidos de cabeça e dos membros sem objetivo adaptativo. Em experimentos, que o animal tem acesso ilimitado à anfetamina, pode ocorrer a auto-administração de quantidades tão grandes que acarretam a morte por efeitos cardiovasculares dentro de dias (Berman et al., 2009).

Nos humanos ela provoca prazer e euforia, reduz a fadiga, promove melhora da atenção, diminui o sono e o apetite. Pode levar a um quadro de hipertensão arterial, taquicardia e arritmias, alucinações, acompanhada de sintomas paranóides e comportamento agressivo chamado psicose anfetamínica. Podendo apresentar tolerância e levar a dependência (Berman et al., 2009). Essas manifestações cedem após a administração de antagonistas de receptores dopaminérgicos, sobretudo do tipo D2, como a clopromazina e o haloperidol (Frota, 2001).

É usada clinicamente no tratamento do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, na narcolepsia e como supressor de apetite, apesar desta última indicação ser contra-indicada pelos riscos que causam aos pacientes ((Berman et al., 2009; Rang et al, 2012). A anfetamina apresenta um padrão típico de abstinência, manifestado por sinais e sintomas que são o oposto daqueles produzidos pela droga. Os usuários privados da droga ficam sonolentos, tem apetite voraz, ficam exaustos e podem vir a apresentar depressão psíquica. A tolerância desenvolve-se rapidamente de modo que os usuários abusivos podem tomar doses maiores em comparação àquelas usadas no início (Berman et al., 2009).

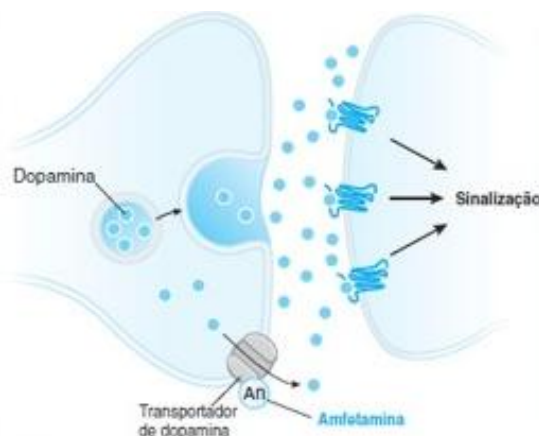


Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação das anfetaminas.

A anfetamina promove um aumento na concentração extracelular de DA e outras monoaminas por vários mecanismos. Elas atuam aumentando a liberação de DA nos terminais sinápticos e bloqueando o transportador da DA inibindo a sua recaptação (Fleckenstein et al.,2007)

### 1.3 BENZODIAZEPÍNICOS

Benzodiazepínicos (BZDs) são psicofármacos que possuem uma estrutura química formada pela fusão de um anel de benzeno e um anel de diazepina. Eles têm como sítio principal de ação o SNC, porém seu mecanismo de ação não está completamente esclarecido, mas já se sabe que eles atuam no sistema gabaérgico. Eles são moduladores alostéricos positivos dos receptores do ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA A), ou seja, agem aumentando a afinidade do GABA por alguns subtipos de receptores A, resultando na inibição do neurônio pós sináptico devido ao aumento da frequência de abertura do canal de cloreto e conseqüente entrada dos íons, levando a uma hiperpolarização da membrana, acarretando uma diminuição da atividade neuronal (Olsen e Betz, 2006).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, e está associado com a cognição, memória e aprendizado, vigilância, controle da excitabilidade neuronal, controle dos ritmos circadianos e redução da ansiedade (Sieghart e Sperk, 2002). As duas classes principais de receptores GABA são: GABA A (receptores ionotrópicos) e GABA B (receptores metabotrópicos acoplado a proteína G); sendo

compostos por diferentes subunidades e subtipos ( $6\alpha$ ,  $4\beta$ ,  $3\gamma$ ,  $1\delta$ ,  $1\epsilon$ ,  $1\pi$ ,  $3\rho$ ,  $1\theta$ ) (Sieghart e Sperk, 2002; Mohler et al, 2001).

O receptor de GABA A possui ligação específica para benzodiazepínicos, a subunidade  $\alpha$  tem se mostrado diretamente relacionada à afinidade das drogas benzodiazepínicas ao receptor GABA A, enquanto que a subunidade  $\gamma$  parece estar diretamente relacionada à eficácia das drogas (Kralic et al., 2002).

Estudos têm revelado que receptores GABA A contendo subunidade  $\alpha 1$  são mediadores dos efeitos sedativos, de amnésia anterógrada e parcialmente aos efeitos anticonvulsivantes, do diazepam (McKernan et al., 2000). As propriedades gratificantes dos benzodiazepínicos têm sido mostradas para exigir o receptor GABA A contendo  $\alpha 1$ . Receptores GABA A contendo  $\alpha 2$  mediam as ações ansiolíticas e os efeitos miorelaxantes (Low et al, 2000). Receptores GABA A contendo  $\alpha 3$  e  $\alpha 5$ , também contribuem para as ações miorelaxantes enquanto receptores GABA A expressando subunidade  $\alpha 5$  foram mostrados para modular os efeitos de memória espacial e temporal dos BZDs (Low et al, 2000).

Os benzodiazepínicos são amplamente usados no tratamento da ansiedade aguda, transtorno de ansiedade generalizada, insônia, transtornos do estresse pós-traumático, epilepsia, síndrome de abstinência ao álcool e em procedimentos de endoscopia (McKernan et al., 2000).

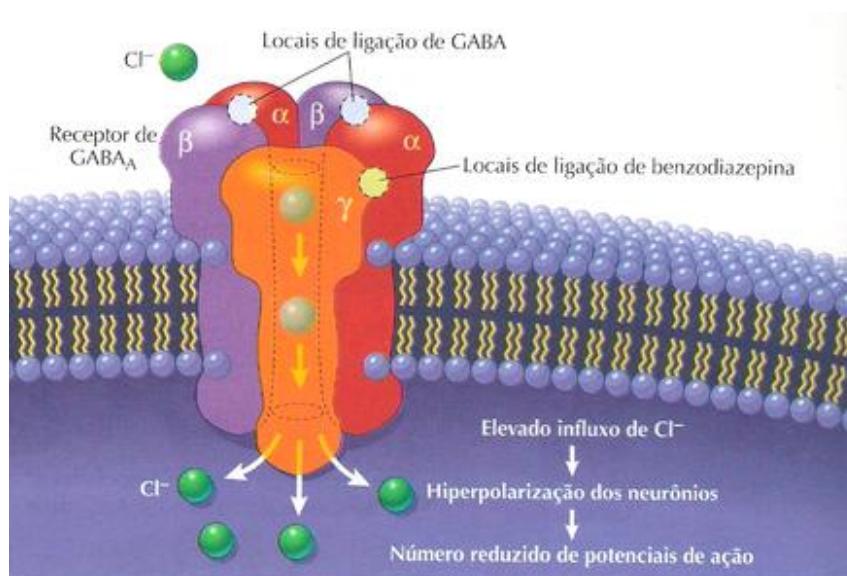


Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de ação dos benzodiazepínicos.

### 1.3.1 Drogas de abuso e benzodiazepínicos

Estudos de microdiálise e voltametria cíclica de varredura rápida têm demonstrado que, enquanto drogas de abuso como a cocaína, anfetaminas e opióides aumentam direta ou indiretamente a concentração de dopamina no núcleo accumbens (Clark et al, 2010; Flagel et al, 2011; Willuhn et al., 2012), os benzodiazepínicos fazem o contrário, reduzem essa liberação (Gomes-A et al., 2017; Zetterstrom e Fillenz, 1990; Yoshida et al, 1999).

Um estudo recente do nosso grupo mostrou que o tratamento com diazepam bloqueia a liberação fásica de dopamina no NAc de camundongos (Gomez-A et al., 2017). Esse e outros estudos mostraram que o diazepam também reduz a liberação tônica de dopamina no NAc (Murai et al., 1994; Zetterstrom e Fillenz, 1990; Finlay et al., 1992; Yoshida et al, 1999). O estudo de Gomez-A e colaboradores (2017) mostrou que o diazepam é capaz de bloquear o efeito da anfetamina em aumentar a liberação fásica de dopamina. Essa descoberta faz dos benzodiazepínicos candidatos para o tratamento do uso abusivo de psicoestimulantes, como mostrado em estudos com modelos animais de auto-administração de drogas (Meririnne et al, 1999; Straub et al, 2010) e também em humanos (Rush et al 2004) mostraram que o tratamento com diazepam e outros benzodiazepínicos reduziu o consumo de anfetaminas. Esses resultados sugerem que o efeito ansiolítico dos fármacos benzodiazepínicos poderia ter um componente dopaminérgico.

### 1.3.2 Diazepam

O diazepam (DZP) é um agonista benzodiazepínico, que potencializa o efeito inibitório do GABA, modulando a atividade dos receptores GABA-A por meio de sua ligação com seu sítio específico (receptor benzodiazepínico). Essa ligação altera a conformação desses receptores, aumentando a afinidade do GABA com seus próprios receptores e a frequência da abertura dos canais de cloreto, provocando hiperpolarização da célula. O resultado dessa hiperpolarização é um aumento da ação gabaérgica inibitória do sistema nervoso central (Cordioli et al, 2011).

O diazepam tem efeito ansiolítico, sedativo, relaxante muscular, amnésico e anticonvulsivante e pode produzir dependência. Possui absorção rápida, sendo completamente absorvido através do trato gastrointestinal. No fígado é

biotransformado por reações oxidativas, produzindo alguns metabólitos ativos, como o nordiazepam.

#### 1.4 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS (USV)

Os ratos emitem vocalizações audíveis ao ouvido humano e ultrassônicas (não audíveis). A emissão de USV é um dos principais meios de comunicação utilizados pelos ratos (Brudzynski, 2007; Brudzynski, 2013; Schwarting et al., 2007).

As gravações de USVs são amplamente usada em estudos pré-clínicos de afeto, motivação e comportamento social. A vocalização de ratos se apresenta de diferentes formas em diversos contextos e estão associadas a estados subjetivos e/ou emocionais (Brudzynski, 2015).

Estudos demonstram que os ratos emitem vocalizações ultrassônicas (USVs) em resposta a estímulos que são capazes de produzir estados emocionais eufóricos (positivos) ou disfóricos (negativos).

Já foram identificadas três tipos de USV em ratos, sendo classificadas de acordo com o seu pico de frequência em chamadas de "22-kHz", "40-kHz" e "50 KHz" (Portfors, 2007). As USVs de "22-kHz" são emitidas por ratos adultos em situações aversivas, em resposta à estímulos ameaçadores como por ex. choque e dor. As de "40-kHz" são emitidas por filhotes quando separados de sua mãe. E as de "50-KHz" são emitidas por ratos adultos em resposta, ou a antecipação de estímulos agradáveis como acasalamento ou "cócegas" por uma mão humana, brincadeiras, encontros sociais com congêneres e com drogas de abuso. A emissão de chamadas de ultra-som de 50 kHz em ratos é conhecida por estar associada a situações comportamentais apetitivas e interações sociais positivas (Burgdorf et al, 2008; Burgdorf et al, 2011).

As USVs de 50 kHz são caracterizadas por um pico de alta frequência, geralmente de 35-80 kHz, e uma curta duração, geralmente de 10-150 ms (Brudzynski, 2013). Estudos farmacológicos tem demonstrado que a emissão de USVs de 50 kHz pode ser modulada por fármacos que possuem propriedades gratificantes e reforçadoras. O aumento da emissão de USVs de 50 kHz foi observado após a administração do psicoestimulante dopaminérgico anfetamina. Outras substâncias de abuso, como cocaína, MDMA, nicotina e cafeína, também

podem influenciar a emissão de 50-KHz USVs em ratos (Mu et al., 2009; Simola et al., 2012; Sadananda et al., 2012; Simola et al., 2014; Simola et al., 2010; Williams e Undieh, 2010).

As USV de 50 kHz podem ser medidas em estudos preocupados com os efeitos motivacionais das drogas de abuso, e em combinação com outros estudos como paradigma de preferência condicionada de lugar (CPP) (Wright et al., 2012), e auto-administração de drogas (Barker, 2010; Barker, 2014; Maier et al., 2012).

A classificação das USVs de 50 kHz são feitas de acordo com as frequências de pico e a forma de cada vocalização. Elas podem ser divididas em simples e complexas ou frequência modulada (Fig.4). O tipo simples pode também ser chamado de flat, esta chamada é marcada quando as alterações de frequência de pico dentro de um único elemento de chamadas, é igual ou inferior a 5 kHz. As USV complexas ou de frequência modulada são: "trill", "step" e "mixed". Trill: apresenta uma única vocalização, com um deslocamento de frequência de pico maior que 5 kHz ou com duas ou mais mudanças de frequência de pico em direções opostas com pelo menos 5 kHz de distância (ondulada ou em ziz zag). Step: apresenta uma chamada flat curta sobreposta no início ou no final de outra USV flat normal, onde existe um pequeno intervalo entre elas, sendo necessário que uma dessas "steps" curtas tenha 5 kHz a mais do que a vocalização flat normal. Chamadas mistas: não se enquadram nas categorias anteriores de USV step e trill, , que consiste em uma mistura de pelo menos 2 tipos de chamadas (trill e flat ou step e flat) (Wendler et al., 2016; Pereira et al., 2014).

As vocalizações flat geralmente são associadas ao comportamento exploratório do animal, e, as complexas ao comportamento social dos animais (Wöhr e Schwarting, 2012, Wöhr et al., 2011).

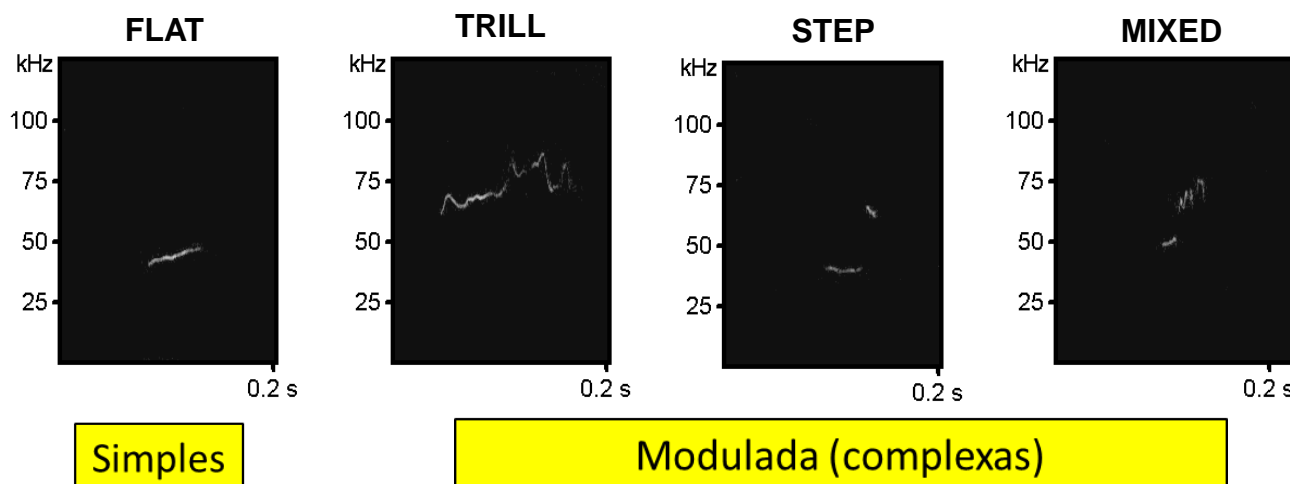


Figura 4: Representação das categorias de vocalizações de 50 kHz

Estados emocionais positivos estão associados com emissão de vocalizações de 50 kHz e podem ser induzida por situações comportamentais repetidas e gratificantes, bem como, direta ou indireta da ativação do núcleo accumbens por drogas dopaminérgicas, incluindo drogas de abuso. Emissões de vocalizações de 50 kHz são mediadas por D1, D2 e parcialmente os receptores de dopamina do D3 (Brudzynski, 2015).



Figura 5: Representação do procedimento para a gravação e análise das USVs

O procedimento para a gravação e análise quantitativa da USV foi descrito por Schwarting et al., (2007). As vocalizações são captadas por um microfone apropriado para registros de ultrassons, o UltraSoundGate Condenser Microphone CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) conectado a um pré-digitalizador e gravador de som Avisoft-RECORDER (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany), que por sua vez é conectado a um computador portátil. As amostras são



armazenadas no disco rígido do computador e analisadas utilizando o programa Avisoft SASLab Pro (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) – fig. 5 (Portifors, 2007; Sadananda et al. 2008; Wöhr et al. 2008).

Através do teste de USV podemos avaliar parâmetros acústicos como: frequência dos picos, largura das bandas, frequência de modulação. E parâmetros não acústicos como: latência, duração média, nº total e tempo total das vocalizações. A obtenção dos valores de duração da vocalização e duração média da vocalização são obtidos de forma que cada vocalização produzida pelo animal é medida em segundos, seus valores são somados e depois é realizado uma média, esses valores expressam efetivamente o tempo em que o animal vocalizou. Para os valores de frequência máxima e frequência mínima é gerado um espectrograma, e a partir dele é obtido os valores de cada uma das vocalizações (Fig. 6).

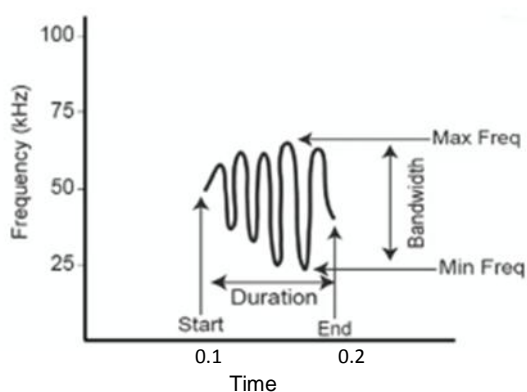


Figura 6: Representação dos parâmetros de uma vocalização de frequência modulada (Johnson et al., 2011).

### 1.5 CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO

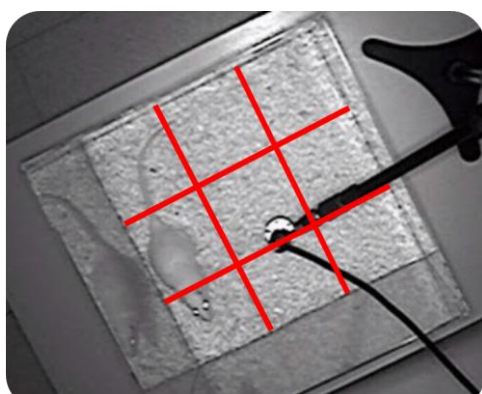
O teste do campo aberto (open field) é realizado em uma arena circular ou quadrada cercada por paredes de forma que o animal não possa fugir. O assoalho é marcado com pequenos quadrados, o que permite a quantificação da atividade locomotora do animal. Esse teste foi desenvolvido por Hall (1934), sugerindo a atividade motora do animal no campo aberto como indicadora de seu estado emocional. O teste de campo aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais, sendo que segundo Sielgel (1946) este teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação ansiolítica (Masur; Martz; Carlini, 1971).

O procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal), frequência de rearings, tempo de autolimpeza (grooming), defecação, tempo gasto para deixar a área central.

A baixa atividade locomotora é indicador de ansiedade do animal. Pode-se também utilizar a atividade locomotora do animal no centro do campo aberto como medida mais seletiva de ansiedade, enquanto a atividade locomotora na periferia do aparato como um indicador da atividade locomotora do animal. O efeito de drogas ansiolíticas tem sido amplamente demonstrado nesse modelo.

O animal é colocado na porção central do aparelho e deixado explorar livremente durante 5 minutos, onde são contados o número total de cruzamentos durante esse período.

A) Ratos



B) Camundongos



Figura 7: Caixa de movimentação

## 1.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado (LCE), também chamado de elevated plus maze, é um modelo animal de ansiedade bastante utilizado para o estudo experimental de drogas ansiolíticas (Ramos, 2008). Desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e posteriormente validado para estudos farmacológicos, fisiológicos e comportamentais por Pellow et al. (1985). Esse modelo é baseado no conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão que ratos apresentam a altura e espaços abertos (Lister, 1990; Rodgers e Cole, 1994; Fernandes e File, 1996; Treit et al, 1993; Pellow et al., 1985).

Tem sido muito usado na compreensão das bases biológicas relacionadas ao aprendizado e memória emocional, dor, hormônios, vício e retirada, bem como no estudo da definição de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade e medo (Carobrez e Bertoglio, 2005).

O LCE é um aparato elevado do chão, constituído de duas passarelas em forma de uma cruz simétrica, apresenta dois braços opostos fechados por paredes laterais, e outros dois braços opostos abertos. Quando o animal é exposto pela primeira vez ao LCE, acredita-se que uma situação de conflito é instalada, entre explorar o ambiente e proteger-se de perigos potenciais.

O modelo foi validado para camundongos por Lister (1987) mostrando ser útil como teste para investigar agentes ansiolíticos e ansiogênicos. Animais tratados com drogas ansiolíticas tendem a aumentar a porcentagem de tempo nos braços abertos e a taxa de entradas nos braços abertos (Griebel et al, 2000; Rosa et al, 2000; Holmes e Rodgers, 1999; Hogg, 1996; Dawson e Tricklebank, 1995; Rodgers e Cole, 1994; Handley e Mcblane, 1993; Lister, 1987; Pellow e File, 1986; Handley e Mithani, 1984).

O modelo mais usado atualmente é o descrito por Pellow e colaboradores (1985), em que o tempo de observação é de cinco minutos.

É considerado um teste rápido, simples e econômico, não necessita de procedimentos de treinamento dos animais, nem de privação de água, alimentos ou de estímulos nocivos (Pellow et al, 1985; Carobrez e Bertoglio, 2005).

O número total de entradas e o número de entradas nos braços fechados são empregados como índice de atividade locomotora (Lapin, 1993; Dawson, 1995; Rodgers e Dalvi, 1997). A porcentagem de tempo e a porcentagem de entradas nos

braços abertos são considerados como uma medida de efeito ansiolítico (Lister, 1987; Pellow et al. 1985). O critério para se caracterizar entrada ou saída dos braços, na maioria dos estudos, é definido como a colocação das quatro patas nos braços ou no quadrado central (Rodgers e Cole, 1994).

No teste do labirinto em cruz elevado o tratamento com diazepam em animais, acarreta um aumento da porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos, sem alterar a atividade locomotora (Dalvi e Rodgers, 1996; Treit, Menard e Royan, 1993; Pellow et al, 1985; Handley e Mithani, 1984).



Figura 8 – Labirinto em cruz elevado

### 1.7 TESTE DE ESCONDER ESFERAS

O teste de esconder esferas (*marble burying test*) é um modelo animal de ansiedade, validado para camundongos por Broekkamp e colaboradores (1986). Nesse teste, são observadas possíveis alterações comportamentais de drogas que possam promover um perfil ansiogênico ou ansiolítico. Isto é determinado pelo aumento ou diminuição do comportamento do animal em esconder esferas de vidro (“bolas de gude”) que são distribuídas, ao acaso, na superfície de uma caixa coberta com cepilho. O aumento de esferas recobertas é apontado como indicativo de “ansiedade” (Treit et al., 1981; Broekkamp et al., 1986), pois supõe-se que um agente estranho possa significar uma ameaça ao animal (Nogueira, 1997). A administração de droga ansiolítica reduz esse comportamento de esconder as esferas de vidro.



Figura 9: Teste de esconder esferas

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi estudar em modelos animais se o diazepam é capaz de bloquear os efeitos gratificantes e psicoestimulantes da anfetamina. Estudar também se os efeitos ansiolíticos do diazepam são alterados pela co-administração de anfetamina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como modelo dos efeitos gratificantes estudamos o efeito dessas drogas sobre a emissão de vocalizações ultrassônicas (USV) na faixa de 50 kHz (Natusch e Schwarting, 2010; Pereira et al, 2014; Wöhr et al., 2008).

Como modelo de efeito psicoestimulantes medimos a atividade locomotora dos animais em um campo aberto (Sielgel, 1946) e no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Como modelo de efeito ansiolítico, utilizamos teste do labirinto em cruz elevado (Handley e Mithani, 1984) e o teste de esconder esferas (Broekkamp et al., 1986).

Os resultados deste estudo são importantes para auxiliar uma melhor compreensão do papel da dopamina na interação entre ansiolíticos e benzodiazepínicos.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 90 ratos Wistar machos adultos (220–330 g) e 40 camundongos Swiss machos adultos (30–40 g) provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com assoalho coberto por serragem em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com ciclo claro-escuro de 12 h (luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), com comida e água à vontade. Em cada caixa foram mantidos até 5 ratos ou até 8 camundongos. Os teste comportamentais foram realizados entre às 13h e 18h; sempre após uma hora de habituação na sala teste. Os mesmos animais foram utilizados para os diferentes testes comportamentais. No entanto, os dados de 4 ratos no teste do labirinto em cruz elevado e de 1 rato no teste de vocalização ultrasônica foram excluídos devido a problemas técnicos com a gravação. Além disso, no teste do labirinto em cruz elevado dados de outros 6 ratos e 4 camundongos foram excluídos porque eles caíram dos braços abertos. O número de animais por grupo está impresso nas legendas das figuras. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação brasileira e com os Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) com número de protocolo 1004. Todos os cuidados para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados foram tomados.

### 3.2 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Os ratos foram aleatoriamente designados para os seguintes grupos: SAL/SAL; SAL/ANF; SAL/DZP; SAL/HALO; DZP/ANF; HALO/ANF. Os camundongos foram escolhidos aleatoriamente para os seguintes grupos: SAL/SAL; SAL/ANF; SAL/DZP; DZP/ANF. Todas as drogas foram diluídas em 0.9% NaCl salina (SAL) e injetadas i.p. 30 min antes do teste nas seguintes doses: ANF, 3 mg/kg anfetamina; DZP, 2 mg/kg diazepam; HALO, 0.2 mg/kg haloperidol. Todas as drogas utilizadas foram fabricadas pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 3.3 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

Após um período de adaptação dos ratos no biotério de no mínimo 7 dias, eles foram testados para USV. No primeiro dia foi realizado um basal das USVs. No dia seguinte eles receberam o tratamento com as drogas de acordo com os grupos acima citados e foram testados após 30 min. As USVs foram gravadas por 5 min. Cada rato foi colocado em uma caixa de acrílico (40 x 40 x 40 cm) com o chão coberto com cepilho. Um microfone para USV foi colocado no centro da caixa, 45 cm acima do piso da caixa (UltraSoundGate Condenser Microphone, CM16; Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany). As USV foram gravadas com software Avisoft Recorder 2.7 (Natusch e Schwarting, 2010; Pereira et al, 2014; Wöhr et al., 2008). As características acústicas USV foram analisadas através do software SAS Lab Pro (Avisoft Bioacoustics) e o número de USV de 50-kHz foram contadas manualmente a partir da espectrogramas. Se duas USVs estavam separadas por pelo menos 0,048s, elas foram computadas como duas USVs independentes. Todas as USVs emitidas acima de 33 kHz foram consideradas como USV de 50 kHz (Pereira et al, 2014; Wöhr et al., 2015). As USVs de camundongos não foram gravadas.

### 3.4 ATIVIDADE LOCOMOTORA

As USVs e o comportamento exploratório dos ratos foram gravados simultaneamente. Para análise da atividade locomotora a imagem da caixa de acrílico (40 x 40 x 40 cm), foi dividida em 9 quadrantes e foi registrado o número de vezes que o rato cruzou as linhas que dividem esses quadrantes por um período de



5 minutos. Os camundongos foram testados em uma caixa (40 cm x 20 cm x 26 cm) equipada com três fotocélulas as quais contava o número de quadrantes percorridos automaticamente também por um período de 5 minutos (Camarini et al., 1995).

### 3.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado imediatamente após os testes de USV e campo aberto. O aparelho para os ratos consistia de dois braços abertos perpendiculares (55 x 10 cm) e dois braços fechados perpendiculares (55 x 10 cm x 40 cm) (Handley e Mithani, 1984). Os camundongos foram testados em um labirinto com braços abertos de 30 cm x 5 cm e braços fechados de 30 cm x 5 cm x 25 cm Lister (1987). Os braços abertos eram cercados por um aro de madeira (0,5 cm de altura) para minimizar as quedas (Pellow et al, 1985). Os aparelhos eram feitos de madeira e ficavam 45 cm acima do chão. O animal era colocado no centro do labirinto e era filmado por 5 min por uma câmara de vídeo. Foram computadas o número de entradas com as 4 patas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. O número total de entradas e o número de entradas nos braços fechados foram considerado como um índice de atividade locomotora (Lapin, 1993; Dawson, 1995; Rodgers e Dalvi, 1997). A porcentagem de tempo e a porcentagem de entradas nos braços abertos foram considerados como uma medida de efeito ansiolítico (Lister, 1987).

### 3.6 TESTE DE ESCONDER ESFERAS

Os camundongos foram submetidos ao teste de esconder esferas imediatamente após teste do labirinto em cruz elevado. Os ratos não passaram por este teste. O camundongo foi colocado em uma caixa de acrílico igual à caixa moradia e foi filmado por 20 min. O fundo da caixa foi coberto com cepilho e esferas de vidro (bolinhas de gude) medindo aproximadamente 1,3 cm de diâmetro foram organizadas em quatro fileiras de seis, totalizando 24 bolinhas de gude. Após 20 minutos o animal foi retirado da caixa e foi contado o número de bolas de gude enterradas. Considerou-se que uma bola estava enterrada quando pelo menos 2/3 dela estava coberta por cepilho (Broekkamp et al., 1986; Njung'e e Handley, 1991).

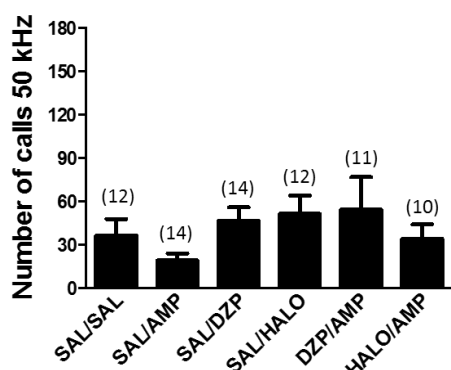
### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentaram uma distribuição normal (teste D'Agostino-Pearson). Eles foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls. E os dados dos testes de ansiedade foram analisados por ANCOVA, usando como co-variante a atividade locomotora. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando  $p < 0.05$ . Os dados foram analisados com o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

O diazepam e o haloperidol bloquearam o aumento das USVs de 50 kHz induzidas por anfetaminas. A ANOVA dos dados da Fig.10A mostrou que antes da administração das drogas não houve diferença significativa entre os grupos [ $F(5, 67) = 1.22$   $P = 0,31$ ]. A ANOVA dos dados Fig. 10B mostrou um efeito significativo do tratamento [ $F(5, 67) = 25,74$   $P < 0,001$ ]. O teste post-hoc de Newman-Keuls mostrou que a administração de anfetamina causou um aumento significativo no número de USV quando comparado com os demais grupos. A administração de diazepam 2 mg/kg e de haloperidol 0,2 mg/kg não ocasionou alterações significantes no números de USVs. Porém, tanto o diazepam quanto o haloperidol bloquearam o efeito da anfetamina.

A) ANTES DO TRATAMENTO COM AS DROGAS  
(BASELINE)

B) APÓS O TRATAMENTO COM AS DROGAS

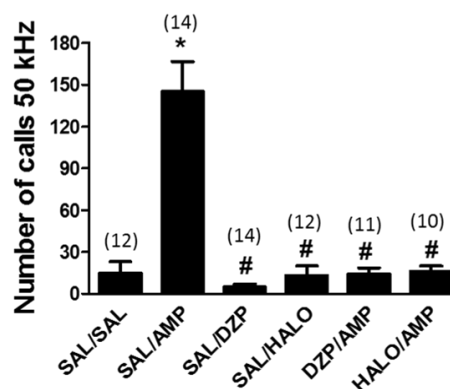


Figura 10: O diazepam bloqueou o aumento de USV de 50 kHz em ratos induzida por anfetamina. SAL, solução salina; AMP, 3 mg / kg de anfetamina, DZP, 2 mg / kg de diazepam, HALO, 0,2 mg / kg de haloperidol. Os fármacos foram administrados i.p. 30 minutos antes do teste. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / SAL; #  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / ANF; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. O número de ratos por grupo está indicado entre parênteses.

Os valores médios dos outros parâmetros de USV estão apresentados na Tabela 1. Independente do tratamento farmacológico, todos os ratos apresentaram USVs na faixa de 50 KHz. As ANOVAS dos dados de largura da banda [ $F(5,49) = 0,37$ ,  $P = 0,86$ ] e frequência de modulação da banda [ $F(5,49) = 0,43$ ,  $P = 0,82$ ] mostraram que não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos. As ANOVAS dos dados da Tabela 1 mostraram efeitos significantes do tratamento para os dados de latência [ $F(5,67) = 4,90$ ,  $P < 0,001$ ], duração média das vocalizações [ $F(5,67) = 6,73$ ,  $P < 0,001$ ] e tempo total das vocalizações [ $F(5,67) = 23,43$ ,  $P < 0,001$ ]. O teste post-hoc de Newman-Keuls mostrou que, comparado aos demais grupos, os animais tratados com DZP/ANF demoraram um tempo significamente maior para apresentar a primeira vocalização. Essa mesma análise também mostrou que o tratamento com ANF causou um aumento significativo na duração média e no tempo total das vocalizações quando comparada ao grupo SAL/SAL. Esses dois efeitos da ANF foram bloqueados pelo DZP. O HALO bloqueou o efeito da ANF sobre o tempo total das vocalizações, mas não sobre a duração média das vocalizações.

Tabela 1 : Efeitos do diazepam, anfetamina e haloperidol em USV de 50 kHz em ratos

Tratamento Parâmetros	sal / sal (12)	sal / anf (14)	sal / dzp (14)	sal / halo (12)	dzp / anf (11)	halo / anf (10)
Latência (s)	6,4±3,6	5,9±2,0	6,1±3,9	7,1±4,0	50,2±18,7 <sup>*#+\$</sup>	29,0±8,9
Duração média (ms)	17±3	27±2 <sup>*</sup>	10±3 <sup>#</sup>	12±3 <sup>#</sup>	13±3 <sup>#</sup>	21±2 <sup>+</sup>
Frequência pico (kHz)	52,1±4,1	58,5±1,4	58,5±1,9	49,2±6,7	52,6±6,8	59,6±2,0
Largura da banda(kHz)	18,4±4,1	16,3±2,6	21,0±4,5	19,6±5,8	15,5±4,8	13,7±4,1
Frequência modulação (kHz)	42,7±6,3	45,2±2,0	44,1±3,6	40,6±6,1	47,4±3,7	48,0±2,6
Tempo total (s)	0,41±0,25	4,00±0,64 <sup>*</sup>	0,11±0,06 <sup>#</sup>	0,27±0,15 <sup>#</sup>	0,30±0,11 <sup>#</sup>	0,35±0,10 <sup>#</sup>

SAL, solução salina; ANF, 3 mg / kg de anfetamina, DZP, 2 mg / kg de diazepam, HALO, 0,2 mg / kg de haloperidol. Os fármacos foram administrados i.p. 30 minutos antes do teste. Os dados representam a média ± SEM. \* P <0,05 em comparação com o grupo SAL / SAL; # P <0,05 em comparação com o grupo SAL / ANF; + P <0,05 em comparação com o grupo SAL / DZP; \$ P <0,05 em comparação com o grupo SAL / HALO; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. O número de ratos por grupo está indicado entre parênteses.

Os efeitos dos tratamentos das drogas sobre os números de diferentes tipos de USV são mostrados na Fig.11. Uma ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo no número de chamados do tipo *flat* [ $F(5, 67) = 15,67$   $P < 0,001$ ] e do tipo *trill* [ $F(5, 67) = 5,91$   $P = 0,001$ ]. Os animais não apresentaram chamadas do tipo mixta e apresentaram um número pequeno de vocalizações do tipo *step*. Nas chamadas do tipo *step* não foram observadas diferenças significantes entre os tratamentos [ $F(5, 67) = 1,84$   $P = 0,12$ ]. Testes de post-hoc revelaram que a anfetamina aumentou o número de vocalizações dos tipos *flat* e *trill* e que esse efeito foi bloqueado pelo diazepam e pelo haloperidol. Esses mesmos dados são apresentados como percentuais de vocalização em gráficos de pizza da Figura 11. Uma ANOVA de duas vias desses dados mostrou uma diferença significativa entre os percentuais dos 3 tipos de USVs ( $F(2,141) = 556$ ,  $P < 0,001$ ). Porém, não foram detectadas diferenças significantes no fator tratamento [ $F(5,141) = 0,0$ ,  $P > 0,99$ ] e

na interação entre os fatores tipo de USV X tratamento [ $F(10,141) = 0,31$ ,  $P = 0,98$ ]. Testes pos-hoc mostraram que o percentual das USVs do tipo *flat* foram significativamente mais frequentes que as USVs dos tipos *trill* e *step* ( $P < 0,001$ ) em todos grupos. Não foram detectadas diferenças significantes entre as USVs dos tipos *trill* e *step*.

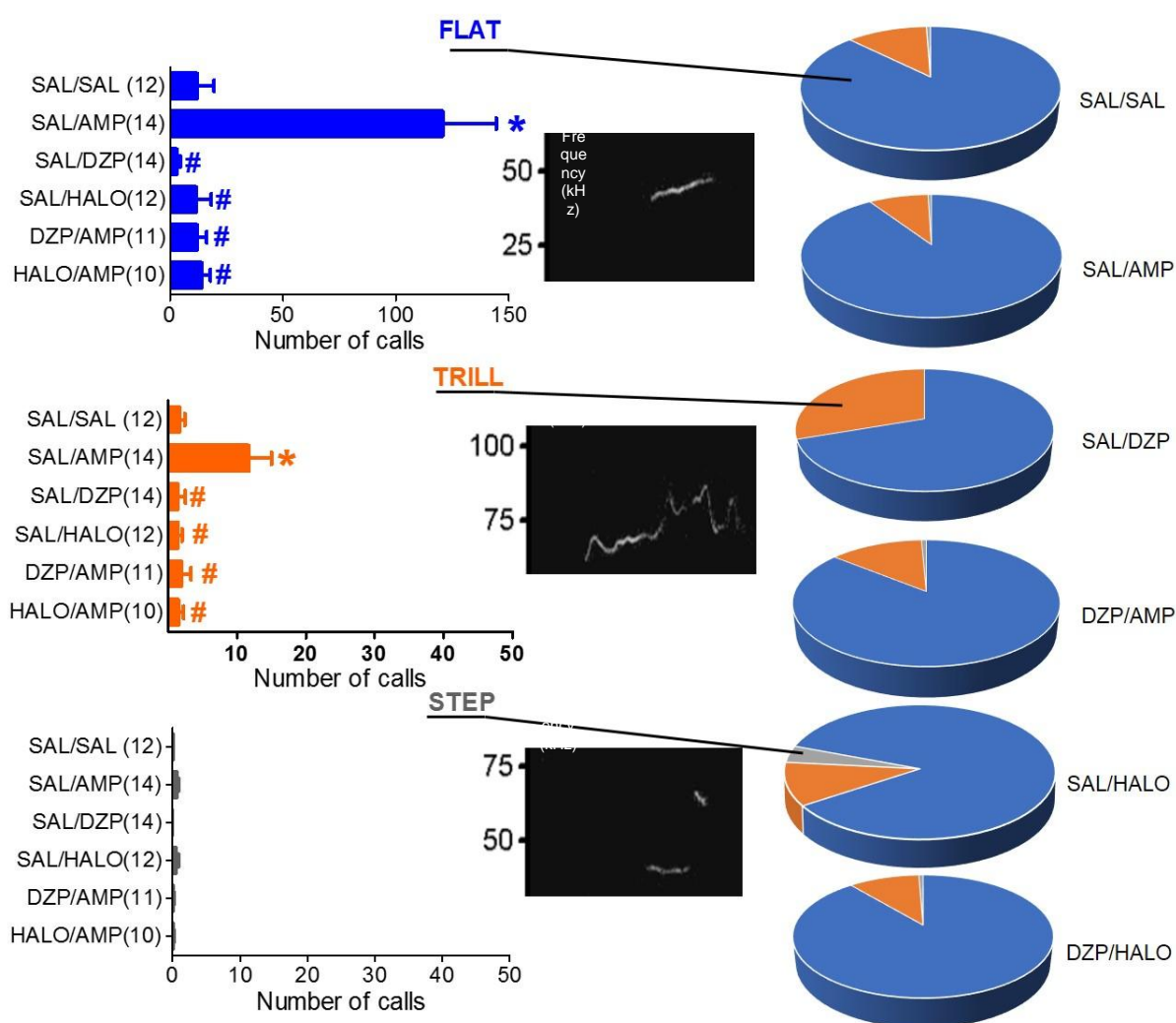


Figura 11. Histograma dos tipos de vocalizações de 50 kHz. As barras expressam as médias  $\pm$  SEM números de USVs dos tipos *flat*, *trill* e *step* e os gráficos de pizza expressam a porcentagem média dessas USVs. Exemplos representativos dos tipos de chamada USVs são mostrados na coluna central. SAL, solução salina; ANF, 3 mg / kg de anfetamina, DZP, 2 mg / kg de diazepam, HALO, 0,2 mg / kg de haloperidol. Os fármacos foram administrados i.p. 30 minutos antes do teste. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / SAL; #  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / ANF; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. O número de ratos por grupo está indicado entre parênteses.

## 4.2 ATIVIDADE LOCOMOTORA

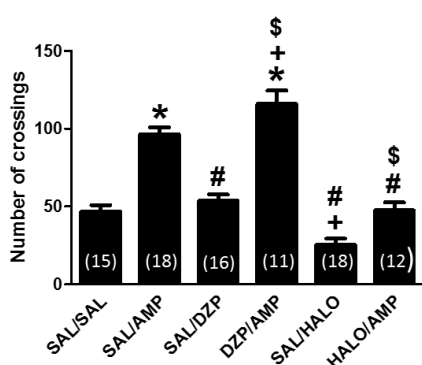
Os efeitos dos tratamentos com drogas na atividade locomotora no campo aberto e labirinto em cruz elevado analisados em ratos e camundongos são mostrados na Fig.12. O número total de entradas (braços abertos + fechados) e o número de entradas nos braços fechados foram avaliados como escores de atividade locomotora no teste do labirinto em cruz. Uma ANOVA de uma via mostrou efeitos significantes para o número de cruzamentos no teste de campo aberto tanto em ratos [Fig. 12A,  $F(5, 84) = 37,75$ ,  $P < 0,001$ ] como em camundongos [Fig. 12B,  $F(3, 28) = 10,78$ ,  $P < 0,001$ ]. Além disso, uma ANOVA de uma via dos scores da atividade locomotora durante o teste do labirinto em cruz elevado, mostrou efeitos significantes para o número de entradas nos braços abertos + fechados em ratos [ $F(5, 74) = 27,14$   $P < 0,001$ ] e camundongos [ $F(3, 37) = 5,719$   $P < 0,01$ ] e para o número de entradas nos braços fechados em ratos [ $F(5, 74) = 10,75$   $P < 0,001$ ] e camundongos [tratamento  $F(3, 37) = 8,57$   $P < 0,001$ ]. Testes pos-hoc mostraram que em ambas espécies o tratamento com anfetamina, mas não o tratamento com diazepam, causou um aumento significativo no número de cruzamentos no teste do campo aberto. Além disso, os testes pos-hoc dos dados do labirinto em cruz elevado mostraram que o tratamento com diazepam não alterou o número de entradas nos braços fechados em ambas as espécies. Este aumento da atividade locomotora causada pelo tratamento com anfetamina não foi bloqueado pelo diazepam. O haloperidol foi usado como controle positivo e bloqueou o efeito da anfetamina quando testado em ratos. Testes post-hoc também mostraram que durante o teste no labirinto em cruz elevado, anfetamina e diazepam causaram um aumento significativo no número de entradas totais (braços fechados + abertos).

O tratamento com anfetamina, mas não com o diazepam, causou um aumento significativo no número de entradas nos braços fechados em ratos e camundongos. Além disso, o haloperidol causou uma diminuição significativa no número de entradas nos braços fechados e bloqueou o efeito da anfetamina em ratos. No entanto, diazepam não bloqueou esse efeito em ratos e nem em camundongos.

O  
P  
E  
N  
  
F  
I  
E  
L  
D

(A)

RATS



(B)

MICE

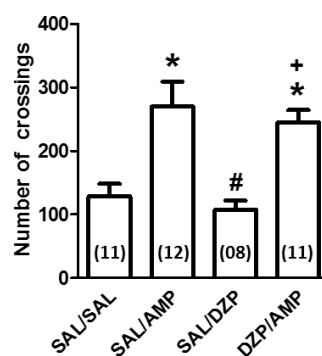
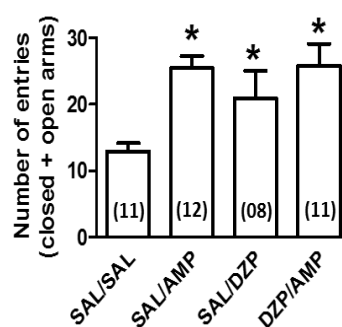
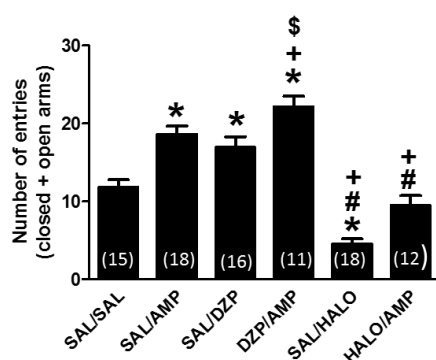
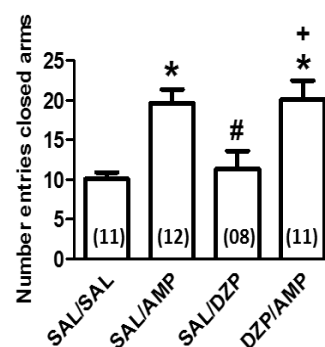
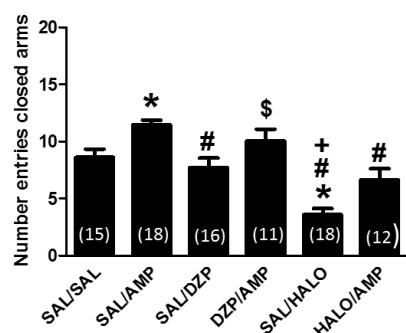
E  
L  
E  
V  
A  
T  
E  
DP  
L  
U  
S  
  
M  
A  
Z  
E

Figura 12. O diazepam não bloqueou o aumento da atividade locomotora induzida pela anfetamina. Os escores de atividade locomotora foram medidos em ratos (A) e camundongos (B) no campo aberto e no labirinto em cruz elevado. As barras representam a média  $\pm$  SEM. SAL, solução salina; AMP, 3 mg / kg de anfetamina, DZP, 2 mg / kg de diazepam, HALO, 0,2 mg / kg de haloperidol. Os fármacos foram administrados i.p. 30 minutos antes do teste. \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / SAL; #  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / ANF; +  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / DZP; \$  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / HALO. ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais por grupo está indicado entre parênteses.



### 4.3 ESCORES DE ANSIEDADE NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Os resultados estão ilustrados na Figura 13. Para descontar um possível efeito da atividade locomotora sobre a análise dos escores de comportamento tipo-ansiolítico, fizemos uma ANCOVA tendo o número total de entradas (braços abertos + braços fechados) como fator de covariância. Essa análise mostrou uma tendência ou um efeito significativo da covariável “número total de entradas” nas análises da: porcentagem de entradas nos braços abertos [ratos,  $F(1,73) = 3,46$ ;  $P = 0,07$ ; camundongos  $F(1,36) = 4,30$ ,  $p < 0,05$ ]; porcentagem de tempo nos braços abertos [ratos,  $F(1,73) = 4,43$ ,  $p < 0,05$ ; camundongos,  $F(1,36) = 7,60$ ,  $p < 0,01$ ]; porcentagem de tempo nos braços fechados [ratos,  $F(1,73) = 4,43$ ,  $P < 0,05$ ], camundongos  $F(1,36) = 7,60$ ,  $P < 0,01$ ]. A ANCOVA também mostrou efeitos significantes para o fator tratamento para a: porcentagem de entradas nos braços abertos [ratos,  $F(5,73) = 9,06$ ;  $P < 0,001$ ; camundongos  $F(3,36) = 8,45$ ,  $p < 0,001$ ]; porcentagem de tempo nos braços abertos [ratos,  $F(5,73) = 4,59$ ,  $p < 0,001$ ; camundongos,  $F(3,36) = 13,28$ ,  $p < 0,001$ ]; porcentagem de tempo nos braços fechados [ratos,  $F(5,73) = 4,59$ ,  $P < 0,001$ ], camundongos  $F(3,36) = 13,28$ ,  $P < 0,001$ ]. Testes post-hoc mostraram que o tratamento com diazepam causou um efeito ansiolítico tanto em ratos como em camundongos: aumentou de forma significativa a porcentagem de tempo e o número de entradas nos braços abertos e diminuiu de forma significativa a porcentagem de tempo nos braços fechados. O tratamento com anfetamina causou um aumento significativo na porcentagem de tempo nos braços abertos nos ratos, mas não nos camundongos. Porém, o tratamento com anfetamina não alterou nenhum dos demais escores do teste do labirinto em cruz elevado, tanto em ratos como em camundongos. Em camundongos, a anfetamina também reverteu todos efeitos do diazepam sobre os comportamentos do “tipo ansiolítico” (aumento das entradas e do tempo de exploração nos braços abertos e redução das entradas nos braços fechados). Porém, esse efeito da anfetamina não foi observado em ratos. O tratamento de ratos com haloperidol não alterou nenhum dos escores dos comportamento do “tipo ansiolítico”, mas reverteu o efeito da anfetamina sobre esses escores.

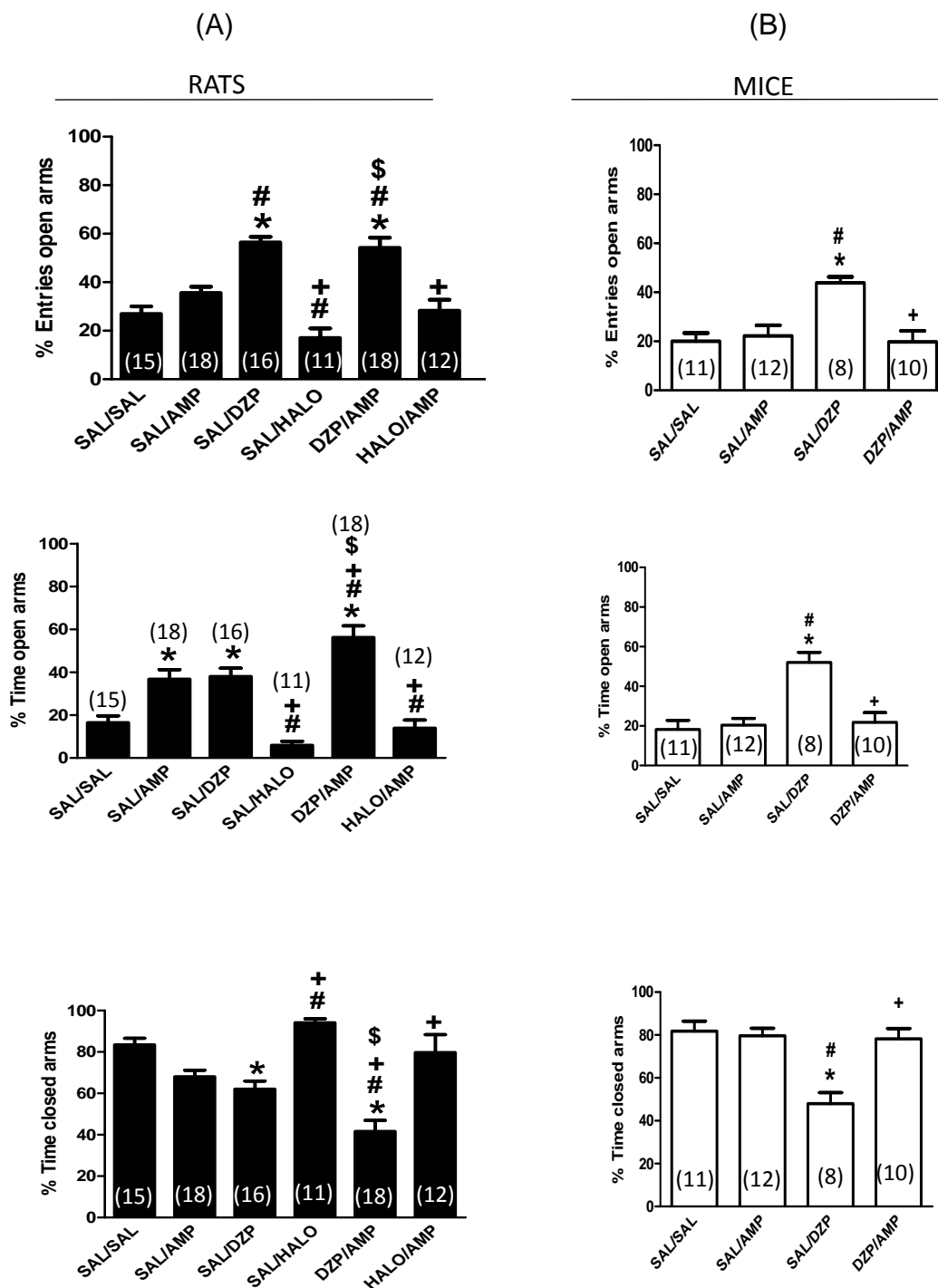


Figura 13. Efeito da anfetamina sobre o efeito ansiolítico do diazepam. Barras representam média  $\pm$  SEM do score de comportamentos tipo ansiolíticos em ratos (A) e camundongos(B) no teste do labirinto em cruz elevado. SAL, solução salina; AMP, 3 mg / kg de anfetamina, DZP, 2 mg / kg de diazepam, HALO, 0,2 mg / kg de haloperidol. Os fármacos foram administrados i.p. 30 minutos antes do teste. \* P <0,05 em comparação com o grupo SAL / SAL; # P <0,05 em comparação com o grupo SAL / ANF; + P <0,05 em comparação com o grupo SAL / DZP; \$ P <0,05 em comparação com o grupo SAL / HALO. ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais por grupo está indicado entre parênteses.

#### 4.4 ESCORES DE ANSIEDADE NO TESTE DE ESCONDER ESFERAS

Os dados do teste de esconder esfera foram analisados por ANCOVA tendo o número de cruzamentos no teste do campo aberto como covariável. Não foi detectado efeito significativo da covariável [ $F(1,27) = 3,23$ ,  $p = 0,08$ ]; o fator tratamento foi significativo [ $F(3,27) = 8,98$ ,  $p < 0,001$ ]. Os testes post-hoc mostraram reduções significantes nos números de esferas escondidas pelos camundongos tratados tanto com anfetamina como com diazepam.

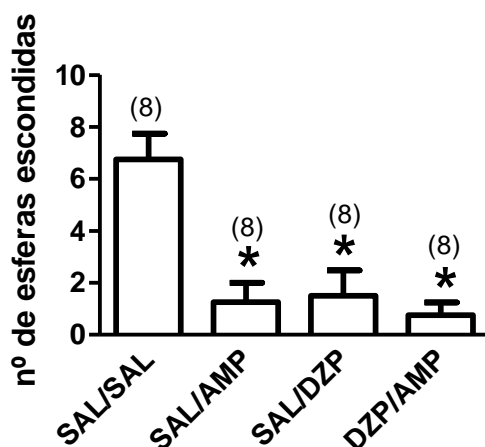


Figura: 14 - Efeitos do diazepam e anfetamina no teste de esconder esferas. SAL, solução salina; AMP, 3 mg / kg de anfetamina, DZP, 2 mg / kg de diazepam. Os fármacos foram administrados i.p. 30 minutos antes do teste. O número de camundongos por grupo está indicado entre parênteses. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo SAL / SAL. ANCOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

## 5 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que mostra que o tratamento com diazepam foi capaz de bloquear o aumento no número de USVs de 50 KHz em ratos tratados com anfetamina. Estudos anteriores mostraram uma redução de USVs de 50 kHz espontâneas (não induzidas por drogas) após a administração de diazepam e outros benzodiazepínicos como clordiazepóxido, alprazolam, zolpidem e oxazepam, sendo esse efeito revertido pelo flumazenil, um antagonista do receptor benzodiazepínico (Olivier et al., 1998; Rowlett et al., 2001; Hodgson et al., 2008; Schwarting e Wöhr, 2012). No presente trabalho não observamos alteração na duração das vocalizações nos ratos tratados com diazepam, mas ele reverteu o aumento na duração média e no tempo total das vocalizações causado pela anfetamina. Além disso, observamos que os animais tratados de forma concomitante com diazepam e anfetamina demoraram em média 45 segundos a mais que os animais dos outros grupos para iniciar as vocalizações.

Baseados em estudos anteriores (Ahrens et al, 2013; Wright et al, 2013; Pereira et al, 2014; Natusch e Schwarting, 2010) podemos hipotetizar que o diazepam atenuou as USVs induzidas por anfetamina porque ele é capaz de bloquear o efeito gratificante das drogas de abuso. Um aumento dessas USVs foi observado após a administração sistêmica de psicoestimulantes dopaminérgicos como a anfetamina (Ahrens et al, 2013; Wright et al, 2013; Pereira et al, 2014; Natusch e Schwarting, 2010) e a cocaína (Barker et al, 2010; Wintink e Brudzynski, 2001; Burgdorf et al., 2001; Mu et al, 2009; Williams e Undieh, 2010). Um aumento no número de USVs de 50 kHz durante a auto-administração de anfetamina (Barker et al., 2014) e de cocaína (Maier et al., 2012) foi também observado em outros estudos. Ratos também emitem USVs de 50 kHz (USV) em situações apetitivas, em resposta a estímulos prazerosos como acasalamento, brincadeiras, "cócegas" por uma mão humana e encontros sociais com congêneres (Rippberger et al., 2015; Brudzynski, 2013; Burgdorf et al., 2008). Esses achados sugerem que as USVs de 50 kHz podem ser usadas como uma medida dos efeitos motivacionais das drogas de abuso.

Foi sugerido que, além do número de vocalizações, suas características acústicas (frequência e largura das bandas) codificam seu significado afetivo (Brudzynski, 2005). Porém, no presente estudo não observamos alterações na

frequência de pico e na largura das bandas de USVs após o tratamento com anfetamina, diazepam ou haloperidol. Observamos, entretanto, um aumento nas USV do tipo *flat* e *trill*, sendo esse efeito bloqueado tanto pelo diazepam como pelo haloperidol. Estudos anteriores mostraram que o tratamento com anfetamina aumenta as vocalizações do tipo *flat* e *trill* (Simola et al., 2012; Wright et al., 2010; Ahrens et al., 2009). Existem evidências de que as vocalizações do tipo *trill* estão correlacionadas com estados emocionais apetitivos (Simola et al., 2012). Um estudo de Burgdorf e colaboradores (2008) mostrou uma correlação positiva entre as USV do tipo *trill* e *step* e a valência apetitiva de situações de acasalamento, brincadeiras, cócegas, pareamento com um co-específico e agressão. Porém, outros estudos mostraram uma diminuição ou nenhuma alteração no número de vocalizações do tipo *trill* após a administração de anfetamina, metanfetamina ou morfina em ratos (Simola et al., 2014; Wright et al., 2012; Mahler et al., 2013). Há um maior consenso em estabelecer que as USVs do tipo *flat* não estão relacionadas a estados emocionais positivos induzidos em situações comportamentais (Burgdorf et al. 2008) e essas USVs são reduzidas por drogas de abuso como o MDMA, a nicotina e a cafeína (Mu et al., 2009; Simola et al., 2012; Sadananda et al., 2012; Simola et al., 2010; Simola et al., 2014; Williams e Undieh, 2010).

Coerente com a hipótese de que USVs de 50 kHz estão relacionadas a um estado emocional com valência positiva, Wright et al. (2010) mostrou um aumento no número de USV em ratos quando eles foram testados em um ambiente previamente pareado com anfetamina, na tarefa de condicionamento de preferência de lugar. A tarefa do condicionamento de preferência de lugar tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta para estudar os mecanismos dos efeitos reforçadores das drogas de abuso (Leri e Franklin, 2000; Galaj et al., 2014). Vários estudos mostraram que a preferência condicionada e a aversão condicionada por um lugar pareado com anfetamina, cocaína, morfina ou heroína foram bloqueadas pela co-administração de antagonistas dopaminérgicos com maior afinidade pelos receptores D2, tais como o haloperidol e a metoclopramida (Schwartz e Marchok, 1974; Spyraiki et al., 1982; Spyraiki et al., 1983; Mithani et al., 1986; Spyraiki et al., 1987; Hoffman e Beninger, 1989). Coerente com a hipótese de que as benzodiazepinas bloqueiam o efeito reforçador de drogas de abuso, Leri e Franklin (2000) demonstraram que a administração sistêmica de diazepam bloqueou a preferência condicionada de lugar induzida pela administração sistêmica de

anfetamina e do agonista do receptor kappa U50-488, mas não bloqueou a preferência condicionada de lugar CPP induzida por morfina. Outro estudo mostrou que o pré-tratamento com diazepam preveniu a preferência de lugar induzida por cocaína e anfetamina (Meririnne et al., 1999).

No presente estudo observamos que, além do diazepam, a administração de haloperidol, um antagonista dopaminérgico que atua principalmente em receptores D2 (Rippberger et al., 2015), também bloqueou o aumento das USVs induzidas por anfetamina. Isso sugere que o bloqueio das USV induzidas por anfetamina pelo diazepam decorrem de ação dessa droga no sistema dopaminérgico mesolímbico de recompensa. Outros estudos mostraram também uma redução no número e alterações qualitativas das USVs em ratos tratados com haloperidol (Rippberger et al., 2015; Ciucci et al., 2007; Wright et al., 2013) e em ratos com depleção unilateral de dopamina estriatal (Ciucci et al., 2007). A administração sistêmica com outros antagonistas dos receptores D1 e D2, tais como SCH 23390 e SCH 39166, clozapina, risperidona, raclopride, eticlopride, pimozida, lítio e tamoxifeno também bloqueiam o aumento das USVs induzido por anfetamina (Brudzynski, 2015; Wendler et al., 2016; Pereira et al., 2014). Além disso, a microinjeção de anfetamina no NAc de roedores apresenta um efeito reforçador e também evoca USV de 50 Hz em ratos (Burgdorf et al., 2001; Thompson et al., 2006; Natusch e Schwarting, 2010). Nossos resultados estão coerentes com trabalhos anteriores, os quais, a administração intra-NAc de antagonistas D1 e D2 também suprimiu as USVs induzidas por anfetamina (Rippberger et al., 2015; Barker et al., 2015).

A liberação de dopamina no núcleo accumbens é um dos principais mecanismos dos efeitos reforçadores da maioria das drogas de abuso (Wise e Rompre, 1989). A maioria das drogas de abuso causam um aumento na liberação de dopamina no NAc (Imperato e Di Chiara 1986). Os níveis de dopamina no núcleo accumbens de ratos aumentam quando eles são colocados em um ambiente previamente pareado com drogas de abuso como anfetamina e cocaína (Meririnne, 1999; Mithani et al., 1986).

A anfetamina promove um aumento na concentração extracelular de dopamina e outras monoaminas por vários mecanismos. Ela atua bloqueando o transportador da dopamina (DAT), o transportador da noradrenalina (NET) e, em menor nível, ela também bloqueia o transportador da serotonina (SERT). A anfetamina também compete com os neurotransmissores monoaminérgicos quando

eles são transportados por essas proteínas. Após ser transportada para dentro do terminal pré-sináptico a anfetamina inibe o transportador de monoaminas vesicular do tipo 2 (VMAT2) e promove a liberação das monoaminas para a fenda sináptica (Robertson et al., 2009). Estudos de microdiálise e voltametria cíclica de varredura rápida têm demonstrado que, enquanto drogas de abuso como a cocaína, anfetaminas e opióides aumentam liberação de dopamina no NAc, (Clark et al, 2010; Flagel et al, 2011; Willuhn et al., 2012; Koob e Volkow, 2010), os benzodiazepínicos fazem o contrário, diminuem essa concentração (Gomes-A et al., 2017; Murai et al., 1994; Zetterstrom e Fillenz, 1990; Finlay et al., 1992; Yoshida et al, 1999). Em um estudo recente onde medimos a liberação de dopamina por voltametria cíclica e por microdiálise *in vivo*, mostramos que a administração sistêmica de diazepam bloqueia o efeito da anfetamina sobre a liberação de dopamina no NAc de roedores (Gomez-A et al., 2017). O presente estudo sugere que, ao bloquear liberação de dopamina no NAc induzida pela anfetamina, o diazepam bloqueia o seu efeito reforçador. Isso faz dos benzodiazepínicos candidatos em potencial para o tratamento do uso abusivo de psicoestimulantes e outras drogas de abuso.

As drogas de abuso da classe dos psicoestimulantes, como as anfetaminas (Gould et al., 2007), a cocaína (Johanson e Fischman, 1989) e a nicotina (Robinson e Becker, 1986) promovem um aumento da atividade locomotora em roedores. Com o objetivo de avaliar se, além de antagonizar o efeito reforçador, o diazepam também antagoniza os efeitos psicoestimulantes da anfetamina, medimos a atividade locomotora de ratos e camundongos tratados com essas drogas no teste do campo aberto e no teste do labirinto em cruz elevado. O teste do campo aberto (Siegel, 1946) é amplamente utilizado para estudar o efeito de psicoestimulantes sobre a atividade locomotora, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação ansiolítica (Carey et al., 2005). A administração de diazepam não bloqueou o aumento na atividade locomotora induzida por anfetamina nas duas espécies. A administração de haloperidol foi usada como um controle positivo de um antagonista dopaminérgico capaz de bloquear o aumento da ambulação no campo aberto induzido pela anfetamina (Bruhwyler et al., 1991).

O labirinto em cruz elevado é mais usado para avaliar o efeito ansiolítico de drogas (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985). Porém, drogas de abuso como a anfetamina também alteram parâmetros da atividade locomotora que são menos

afetados por ansiolíticos tais como o número total de entradas e o número de entradas nos braços fechados do labirinto (Lapin, 1993; Dawson et al., 1995). De forma coerente, observamos que o haloperidol bloqueou o aumento desses parâmetros de ambulação em ratos. Porém, o diazepam não bloqueou os efeitos da anfetamina tanto em ratos como em camundongos. Esses resultados sugerem que o efeito do diazepam é específico para o efeito gratificante da anfetamina, não tendo nenhum efeito sobre a ação psicoestimulante dessa droga.

Na clínica os benzodiazepínicos são amplamente usadas no tratamento da ansiedade generalizada (Hollister et al., 1993; Andreatini et al., 2001) e para tratar a ansiedade causada pela abstinência de drogas de abuso (Goeders, 1997). Portanto, é importante avaliar se psicoestimulantes como a anfetamina bloqueia o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos. Com esse objetivo avaliamos se a anfetamina altera os efeitos ansiolíticos do diazepam nos testes do labirinto em cruz elevado e no teste de esconder esferas. Escolhemos estes testes porque no labirinto em cruz elevado os escores de efeito ansiolítico (maior exploração dos braços abertos) estão correlacionados com uma maior atividade locomotora, enquanto o escore de efeito ansiolítico do teste de esconder esferas depende da redução de um comportamento motor (esconder as esferas). Para diminuir a influência do efeito psicoestimulantes da anfetamina sobre os escores de ansiedade, analisando esses dados por ANCOVA onde tendo um escore de atividade locomotora como co-variante. Coerente com estudos clássicos da literatura (Rodgers e Dalvi, 1997; Pellow et al., 1985; Handley e Mithani, 1984; Broekkamp et al., 1986) encontramos que o diazepam causou um efeito ansiolítico nos dois testes.

No presente estudo observamos que a anfetamina aumentou a exploração dos braços abertos do labirinto. Esse efeito foi também relatado em um estudos anterior (Dawson et al., 1995). Porém outros estudos encontraram efeitos opostos Pellow et al., 1985; Lapin, 1993) ou nenhum efeito (Lister, 1987) das anfetaminas em ratos e/ou camundongos. É provável que o efeito que observamos da anfetamina sobre a exploração dos braços aberto tenha sido influenciada pelo aumento na atividade locomotora. Dawson et al (1985) mostraram que uma dose mais baixa de anfetaminas causa um aumento da exploração dos braços abertos e aumento no número total de entradas nos braços abertos + braços fechados. Eles interpretaram esses resultados como evidência de que a atividade locomotora aumentada pode prejudicar a interpretação da interpretação dos braços abertos como comportamento



do tipo ansiolítico. Outras variáveis tais como linhagens dos animais, diferenças nas dimensões do labirinto em cruz, níveis de iluminação e diferentes procedimentos comportamentais podem também afetar o efeito de drogas nos escores do teste do labirinto em cruz elevado. Camundongos e ratos pertencem a espécies diferentes, apresentando algumas diferenças genéticas (Levan-1991; Burt et al. 1999, Grutzner et al., 1999 e Watanabe et al., 1999). As diferenças entre ratos e camundongos podem estar relacionadas a diferentes níveis de expressão de comportamentos do tipo ansiedade entre essas espécies (Archer, 1973; Logan et al., 1988).

Também de acordo com resultados anteriores da literatura (Jimenez et al., 2011; Thomas et al., 2009), observamos que em camundongos a anfetamina apresentou uma diminuição no nº de bolinhas escondidas. Embora esse comportamento seja interpretado como “ansiolítico” em animais tratados com anfetamina, é possível que, assim como no labirinto em cruz, o efeito psicoestimulante da anfetamina tenha contaminado o seu efeito. Ao contrário dos camundongos tratados com diazepam que não escondem esferas porque não as toma como ameaça (efeito ansiolítico), é possível que ao estarem mais agitados os camundongos prestem menos atenção nas esferas ou mesmo que prefiram gastar mais tempo explorando o ambiente do que escondendo as esferas.

## **6 CONCLUSÃO**

O presente trabalho sugere que os benzodiazepínicos podem bloquear o efeito gratificantes das anfetaminas sem alterar seu efeito psicoestimulante. Em algumas situações particulares as anfetaminas podem reduzir o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos.

Esses resultados sugerem que os benzodiazepínicos são candidatos a serem usados no tratamento da dependência de drogas de abuso, devido bloquear seus efeitos gratificantes. Porém, mais estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para testar esse potencial antes que os benzodiazepínicos possam ser usados para esse fim na clínica.

## 7 REFERÊNCIAS

- Ahrens AM, Nobile CW, Page LE, Maier EY, Duvauchelle CL, Schallert T Individual differences in the conditioned and unconditioned rat 50-kHz ultrasonic vocalizations elicited by repeated amphetamine exposure. *Psychopharmacology*, 2013, 229:687–700.
- Ahrens, A.M., Ma, S.T., Maier, E.Y., Duvauchelle, C.L., Schallert, T. Repeated intravenous amphetamine exposure: rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. *Behav. Brain Res.*, 2009, 197(1), 205-209.
- Andreatini R., Boerngen RL, Filho DZ. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder: future perspectives. *Rev Bras Psiquiatr* 2001;23(4):233-242.
- Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*, 1973, 21(2), 205–235.
- Barker, D.J., Root, D.H., Ma, S, Jha, S., Meghee, L., Pawlak, A.P., West, M.O. Dose-dependent differences in short ultrasonic vocalizations emitted by rats during cocaine self-administration. *Psychopharmacology*, 2010, 211(4), 435-442.
- Barker, D. J., Simmons, S. J., West, M. O. Ultrasonic vocalizations as a measure of affect in preclinical models of drug abuse: A review of current findings. *Curr. Neuropharmacol.*, 2015, 13, 193-210.
- Barker, D.J., Simmons, S.J., Servilio, L.C., Bercovicz, D., Ma, S., Root, D.H., Pawlak, A.P., West, M.O. Ultrasonic vocalizations: evidence for an affective opponent process during cocaine selfadministration. *Psychopharmacology*, 2014, 231(5), 909-918.
- Berman,S.M., Kuczenski,R., McCracken, J.T., Londonol E.D. Potential Adverse Effects of Amphetamine Treatment on Brain and Behavior: A Review. *Psychiatry.*, 2009,14(2): 123–142
- Bjorklund, A.; Dunnett, S.B. Dopamine neuron system in the brain na update. *Trends in Neurosciences*, 2007, 30(5), 194-202.
- Bressan RA, Pilowskv LS. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2003; 25:177-183.
- Broekkamp CL, Rijk HW, Joly-Gelouin D, Lloyd KL. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol.* 1986; 126:223–229.
- Brudzynski, S.M. Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behav. Brain Res.*, 2007, 182(2), 261-273.
- Brudzynski, S.M. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2013, 23(3), 310-317.

Brudzynski, S.M. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Curr. Neuropharmacol.*, 2015, 13, 164-179.

Brudzynski, S.M. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behav. Genet.*, 2005, 35(1), 85-92.

Bruhwyler J.; Chleide E.; Liégeois J-F.; Delarge J.; Mercier M. Effects of specific dopaminergic agonists and antagonists in the open-field test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1991, 39 (2) 367–371.

Burgdorf, J., Kroes, R.A., Moskal, J.R., Pfaus, J.G., Brudzynski, S.M., Panksepp, J. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J. Comp. Psychol.*, 2008, 122(4), 357-367.

Burgdorf, J., Panksepp, J., Moskal, J.R. Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neurosci Biobehav. Rev.*, 2011, 35(9), 1831-1836.

Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J, Ikemoto S. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Neurosci*, 2001,115(4),940 –944.

Burt DW, Bruley C, Dunn IC, Jones CT, Ramage A, Law AS, Morrice DR, Paton IR, Smith J, Windsor D, Sazanov A, Fries R, Waddington D. The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals. *Nature*.1999, 402(6760),411-3.

Camarini, R, Andreatini, R, Monteiro MG. Prolonged treatment with carbamazepine increases the stimulatory effects of ethanol in mice. *Alcohol*, 1995,12 (4), 305-308.

Carey, R.J., DePalma G, Damianopoulos E. Acute and chronic cocaine behavioral effects in novel versus familiar environments: open-field familiarity differentiates cocaine locomotor stimulant effects from cocaine emotional behavioral effects. *Behavioural Brain Research* 2005, 158 (2) 321–330

Ciucci, M.R., Ma. S.T., Fox. C., Kane. J.R., Ramig, L.O., Schallert, T. Qualitative changes in ultrasonic vocalization in rats after unilateral dopamine depletion or haloperidol: a preliminary study. *Behav. Brain Res.*, 2007, 182(2), 284-289.

Clark JJ, Sandberg SG, Wanat MJ, Gan JO, Horne EA, Hart AS, Akers CA, Parker JG, Willuhn I, Martinez V, Evans SB, Stella N, Phillips PE. Chronic microensors for longitudinal, subsecond dopamine detection in behaving animals. *Nat Methods*, 2010, 7:126 –129.

Cordioli, A. *Psicofármacos*. 4ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.

Da Cunha, C.; Gomes-A, A.; Blaha CD. The role of the basal ganglia in motivated behavior. *Reviews in the Neurosciences*, 2012 23, 747-767.

Darv, M.; Wunsch, A. M.; Gibbs, J. T.; Palmiter, R. D. Dopamine dependency for acquisition and performance of Pavlovian conditioned response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2014, 111, 2764-2769.

Dawson, G. R.; Crawford, S. P.; Collinson, N.; Iversen, S. D.; Tricklebank, M. D.: Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology (Berlin)* 1995, 118: 316–323.

Di Chiara, G., Imperato, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85 (14), 5274-5278.

Finlay, J. M., Damsma, G., and Fibiger, H. C. Benzodiazepine-induced decreases in extracellular concentrations of dopamine in the nucleus-accumbens after acute and repeated administration. *Psychopharmacol.*, 1992, 106, 202-208.

Flagel SB, Clark JJ, Robinson TE, Mayo L, Czuj A, Willuhn I, Akers CA, Clinton SM, Phillips PE, Akil H A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. *Nature*, 2011, 469:53–57.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007, 47, 681–698.

Foerde, K.; Shohamy, D. The role of the basal ganglia in learning and memory: insight from Parkinson's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2011, 96, 624-636.

Frota, L. H. Cinquenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria: I fenotiazinas alifáticas. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, 2001, 50 (3-4), 121-141.

Galaj E, Ananthan S, Saliba M, Ranaldi R. The effects of the novel DA D3 receptor antagonist SR 21502 on cocaine reward, cocaine seeking and cocaine-induced locomotor activity in rats. *Psychopharmacology*, 2014, 231, 501–510.

Gilman, A., Goodman, L. (2012). *The pharmacological basis of therapeutics*. Rio de Janeiro, McGraw-Hill.

Goeders NE. A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroend.*, 1997, 22, 237-259.

Gomez-A, A., Fiorenza, AM., Boschen, SL., Sugi, AH., Beckman, D., Ferreira ST., Lee, K., Blaha, CH., Da Cunha, C. Diazepam Inhibits Electrically Evoked and Tonic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens and Reverses the Effect of Amphetamine. *ACS Chemical Neuroscience*, 2017, 8 (2), 300–309.

Gould, T.D., O'Donnell, K.C., Picchini, A.M., Manji, H.K. Strain differences in lithium attenuation of d-amphetamine-induced hyperlocomotion: a mouse model for the genetics of clinical response to lithium. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 32(6), 1321-1333.

Grahn, J. A.; Parkinson, J. A.; Owen, A. M. The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behavioural Brain Research*, 2009 199, . 53-60.

Grutzner F, Himmelbauer H, Paulsen M, Ropers HH, Haaf T. Comparative mapping of mouse and rat chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1999;55(3),306-13.

Handley, S. L., Mithani, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1984, 327, 1-5.

Hodgson, R.A., Guthrie, D.H., Varty, G.B. Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure: sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2008, 88(3), 341-348.

Hoffman DC, Beninger RJ. The effects of selective dopamine D1 or D2 receptor antagonists on the establishment of agonist induced place conditioning in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1989, 33:273–279.

Hollister LE, Müller-Oerlinghausen, Rickels K, Shader RI. Clinical uses of benzodiazepines. *J Clin Psychopharmacol* 1993;13(6 Suppl 1):1S-169S.

Imperato A, Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1986; 239(1):219–228.

Johnson, A. M., Doll, E. J., Grant, L. M., Ringel, L., Shier, J. N., Ciucci, M. R. Targeted Training of Ultrasonic Vocalizations in Aged and Parkinsonian Rats. *Journal of Visualized Experiments*, 2011, 54, 2835.

Johanson C.E., Fischman M.W. The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol* 1989, 41, 3–52.

Jimenez-Gomez C, Osentoski A, Woods JH. Pharmacological evaluation of the adequacy of marble burying as an animal model of compulsion and/or anxiety. *Behavioural pharmacology*. 2011;22(7):711-713

Kolb, B.; Whishaw, I.Q. *Fundamentals of Human Neuropsychology*. 5th ed Worth Publishers: New York, 2003.

Koob, G. F., and Volkow, N. D. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010, 35, 217–238.

Koob, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1992, 13, 177-184.

Kralic, J.E.; O'Buckley, T.K., Khisti, R.T., Hodge, C.W., Homanics, G.E., Morrow, A. L. GABA A receptor alpha- 1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacology* 2002; 43: 685-694.

Lapin, I. P.: Anxiogenic effect of phenylethylamine and amphetamine in the elevated plus-maze in mice and its attenuation by ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1993, 44:241–243.

Leri, F., Franklin K.B. Effects of diazepam on conditioned place preference induced by morphine or amphetamine in the rat. *Psychopharmacology*, 2000, 150 (4): 351-60.

Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Klinga K, Hanson C, Islam MQ.. The gene map of the Norway rat (*Rattus norvegicus*) and comparative mapping with mouse and man. *Genomics.*, 1991,10(3), 699-718.

Lin, H.Q; Burden P.M.; Christie M.J.; Johnston G.A.R.The Anxiogenic-Like and Anxiolytic-Like Effects of MDMA on Mice in the Elevated Plus-Maze: A Comparison With Amphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*,1999; 62(3), 403–408.

Lister, R. G.: The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berlin)* 1987, 92:180–185.

Logan BJ, Laverty R, Sanderson WD, Yee YB. Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) neurotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 1988,152(3),227-34.

Low, K.; Crestani, F.; Keist, R.; Benke, D.; Brunig, I.; Benson, J.A.; Fritsch, J.M.; Rulicke, T.; Bluethmann, H.; Mohler, H.; Rudolph, U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science Wash DC*, 2000, 290:131–134.

Mahler, S.V., Moorman, D.E., Feltenstein, M.W., Cox, B.M., Ogburn, K.B., Bachar, M., McGonigal, J.T., Ghee, S.M., See, R.E. A rodent "self-report" measure of methamphetamine craving? Rat ultrasonic vocalizations during methamphetamine self-administration, extinction, and reinstatement. *Behav. Brain Res.*, 2013, 236(1),78-89.

Maier, E.Y., Abdalla, M., Ahrens, A.M., Schallert, T., Duvauchelle, C.L. The missing variable: ultrasonic vocalizations reveal hidden sensitization and tolerance-like effects during long-term cocaine administration. *Psychopharmacology*, 2012, 219(4), 1141-1152.

McKernan R M, Rosahl T W, Reynolds D S, Sur C, Wafford K A, Atack J R, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore K W, Carling R W, Street L J, Castro J L, Ragan C I, Dawson G R, Whiting P J. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA A receptor alpha1 subtype. *Nature Neurosciences*, 2000, 3: 587–592

Meririnne, E., Kankaanpää, A., Lillsunde, P., Seppälä, T. The effects of diazepam and zolpidem on cocaine- and amphetamine-induced place preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1999, 62, 159–164.

Mithani S, Martin-Iverson MT, Phillips AG, Fibiger HC. The effects of haloperidol on amphetamine- and methylphenidate-induced conditioned place preferences and locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1986;90:247–252.

Mohler, H.; Fritschy, J.M.; Rudolph, U. A new benzodiazepine pharmacology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 300:2–8.

Mu, P., Fuchs, T., Saal, D.B., Sorg, B.A., Dong, Y., Panksepp, J. Repeated cocaine exposure induces sensitization of ultrasonic vocalization in rats. *Neurosci. Lett.*, 2009, 453(1), 31–35.

Murai, T., Koshikawa, N., Kanayama, T., Takada, K., Tomiyama, K., and Kobayashi, M. Local-administration of flurazepam has different effects on dopamine release in striatum and nucleus accumbens - a microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, 261, 65–71.

Natusch C, Schwarting RKW. Using bedding in a test environment critically affects 50kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010, 96:251–259.

Njung'e K, Hadley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991; 38:63–67.

Olivier, B., Molewijk, E., van Oorschot, R., van der Heyden, J., Ronken, E., Mos, J. Rat pup ultrasonic vocalization: effects of benzodiazepine receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 358(2), 117–128.

Olsen RW, Betz H (2006). "GABA and glycine". In Siegel GJ, Albers RW, Brady S, Price DD (eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7th ed.). Elsevier, 291–302

Ouachikh O, Dieb W, Durif F, Hafidi A Differential behavioral reinforcement effects of dopamine receptor agonists in the rat with bilateral lesion of the posterior ventral tegmental area. *Behav Brain Res* 2013, 252:24–31

Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M.: Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 1985, 14: 149–167;

Pereira, M., Andreatini, R., Schwarting, R.K., Brenes, J.C. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? *Psychopharmacology*, 2014, 231(13), 2567–2577

Pierce, C.R.; Kumaresan, Vidhya. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience & Biobehavioral reviews* 2006, 30 (2), 215–238.



Portfors, C.V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 2007, 46(1), 28-34.

Rippberger, H., van Gaalen M.M., Schwarting R.K.W., Wöhr, M. Environmental and pharmacological modulation of amphetamine induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Curr. Neuropharmacol.*, 2015, 13, 220-232.

Robertson, S. D., Matthies, H. J. G., and Galli, A. A Closer Look at Amphetamine-Induced Reverse Transport and Trafficking of the Dopamine and Norepinephrine Transporters. *Mol. Neurobiol.*, 2009, 39, 73-80.

Robinson, T.E.; Becker, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res. Rev.*, 1986, 396, 157-198.

Rodgers, R. J., Dalvi, A. Anxiety, defense and the elevated plus maze. *Neurosci. Behav. Rev.* 1997, 21, 801-810.

Rowlett, J.K., Tornatzky, W., Cook, J.M., Ma, C., Miczek, K.A. Zolpidem, triazolam, and diazepam decrease distress vocalizations in mouse pups: differential antagonism by flumazenil and betaCarboline-3-carboxylate-t-butyl ester (beta-CCt). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, 297(1), 247-253.

Rush, C. R., Stoops, W. W., Wagner, F. P., Hays, L. R., and Glaser, P. E. A. Alprazolam attenuates the behavioral effects of D-amphetamine in humans. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2004, 24, 410-420.

Sadananda, M., Natusch, C., Karrenbauer, B., Schwarting, R.K. 50- kHz calls in rats: effects of MDMA and the 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2012, 101(2), 258-264.

Schultz, W. Predictive reward signals of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 1998, 80, 1-27.

Schultz, W. Updating dopamine reward signals. *Current Opinion in Neurobiology*, 2013 23, 229-238.

Schwarting, R.K., Jegan, N., Wöhr, M. Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav. Brain Res.*, 2007, 182(2), 208-222.

Schwarting, R.K., Wöhr, M. On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2012, 45(4), 337-348.

Schwartz AS, Marchok PL. Depression of morphine-seeking behaviour by dopamine inhibition. *Nature*. 1974;248:257-258.

Sieghart, W.; Sperek, G. Subunit composition, distribution and function of GABA A receptor subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2002;2:795-816.

Sielgel, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. *J. Psychol.*, 1946, v.21, p.227-236.

Simola, N., Fenu, S., Costa, G., Pinna, A., Plumitallo, A., Morelli, M. Pharmacological characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: comparison of the effects of different psychoactive drugs and relevance in drug-induced reward. *Neuropharmacology*, 2012, 63(2), 224-234.

Simola, N., Frau, L., Plumitallo, A., Morelli, M. Direct and longlasting effects elicited by repeated drug administration on 50-kHz ultrasonic vocalizations are regulated differently: implications for the study of the affective properties of drugs of abuse. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2014, 17(3), 429-441.

Simola, N., Ma, S.T., Schallert, T. Influence of acute caffeine on 50-kHz ultrasonic vocalizations in male adult rats and relevance to caffeine-mediated psychopharmacological effects. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2010, 13(1), 123-132.

Simola, N. Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. *Current Neuropharmacology*, 2015, 13, 164-179.

Spyraki C, Fibiger HC, Phillips AG. Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1983;79:278–283.

Spyraki C, Fibiger HC, Phillips AG. Dopaminergic substrates of amphetamine-induced place preference conditioning. *Brain Res.* 1982;253:185–193.

Spyraki C, Nomikos GG, Varonos DD. Intravenous cocaine-induced place preference: Attenuation by haloperidol. *Behav Brain Res.* 1987;26:57–62.

Standaert, D.G.; Galanter, J.M. *Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica*. In: Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. *Princípios da Farmacologia*. 2012, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.166-185.

Straub, C. J., Carlezon, W. A., Jr., and Rudolph, U. Diazepam and cocaine potentiate brain stimulation reward in C57BL/ 6J mice. *Behav. Brain Res.*, 2010, 206, 17–20.

Sulzer D. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron*. 2011, 2469(4):628-649

Thomas A, Burant A, Bui N, Graham D, Yuva-Paylor LA, Paylor R. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacol.* 2009; 204:361–373.

Thompson, B., Leonard, K.C., Brudzynski, S.M. Amphetamine induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behav. Brain Res.*, 2006, 168(1), 64-73.

Tritsch, N.X; Sabatini B.L. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron.*, 2012, 76(1):33-50.

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime . Disponível em: <https://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/index.html>. Acesso em 15 fev. 2017.

Wang B, You ZB, Oleson EB, Cheer JF, Myal S, Wise RA Conditioned contribution of peripheral cocaine actions to cocaine reward and cocaine-seeking. *Neuropsychopharmacol* 2013, 38: 1763–1769.

Watanabe, T K., Bihoreau MT, McC L C., Kiguwa S L., Hishigaki H, Tsuji A, Browne J, Yamasaki Y , Miyakita AM, Oga K, Ono T, Okuno S, Kanemoto,N Takahashi E, Tomita K, Hayash H , Adachi M , Webber C, Davis M, Kiel S, Knights C, Smith A, Critcher R, Miller J, Thangarajah T, Day P J.R., Hudson Jr JR., Irie Y, Takagi T, Nakamura Y, Goodfellow P N., Lathrop G. M, Tanigami A, James M R. A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. *Nature Genetics* 1999, 22, 27 – 36

Wendler E., Souza, CP, Vecchia, DD, Kanazawa LKS , Almeida, PHS , Wöhr M , Schwarting RKW., Andreatini R. Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania: Ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats *European Neuropsychopharmacology* 2016, 26, (12) 1900–1908.

Williams, S.N., Undieh, A.S. Brain-derived neurotrophic factor signaling modulates cocaine induction of reward-associated ultrasonic vocalization in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010, 332(2), 463-468.

Willuhn I, Burgeno LM, Everitt BJ, Phillips PE. Hierarchical recruitment of phasic dopamine signaling in the striatum during the progression of cocaine use. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109:20703–20708.

Wintink, A.J., Brudzynski, S.M. The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2001, 70(2-3), 317-323.

Wise RA, Rompre PP. Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*. 1989; 40:191–225

Wöhr M., Houx B., Schwarting, RK, Spruijt, B. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology e Behavior*, 2008, 93;766–776.

Wright JM, Dobosiewicz MR, Clarke PB. The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in amphetamine induced rat ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology* 2013, 225:853– 868.

Wright, J.M., Deng, L., Clarke, P.B. Failure of rewarding and locomotor stimulant doses of morphine to promote adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology*, 2012, 224(4), 477- 487.

Wright, J.M., Gourdon, J.C., Clarke, P.B. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology*, 2010, 211(1), 1-13.

Yoshida, Y., Koide, S., Hirose, N., Takada, K., Saigusa, T., and Koshikawa, N. In vivo microdialysis evidence that midazolam facilitates propofol-induced reduction in rat accumbal dopamine release. *Neurosci. Res. Commun.*, 1999, 25, 121-127.

Zetterstrom, T., and Fillenz, M. Local-administration of flurazepam has different effects on dopamine release in striatum and nucleus accumbens - a microdialysis study. *Neuropharmacol.*, 1990, 29, 129-134.

**ANEXO**

## 8 ANEXOS

Diazepam selectively blocks 50 kHz ultrasonic vocalizations induced in rats by amphetamine

Gisele de Oliveira Guaita<sup>1</sup>, Debora Dalla Vecchia<sup>1</sup>, Roberto Andreatini<sup>1</sup>, Donita L. Robinson<sup>2</sup>, Rainer K.W. Schwarting<sup>3</sup>, Claudio da Cunha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná , Curitiba 81.530-980, PR, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Psychiatry and Bowles Center for Alcohol Studies, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7178, USA.

<sup>3</sup> Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Faculty of Psychology, Philipps-University of Marburg, 35032 Marburg, Germany.

## ABSTRACT

Rewarding stimuli and many drugs of abuse elicit rat 50 kHz ultrasonic vocalizations (USVs) and can induce dopamine release in the nucleus accumbens. We have recently shown that the benzodiazepine diazepam inhibits dopamine release in the NAc and blocks the increase of dopamine induced release of DL-amphetamine. In the present study, we tested the hypothesis that diazepam can also block the increase in locomotor activity and USVs elicited by amphetamine. 50kHz USVs and locomotor behavior were recorded in adult male Wistar rats treated with i.p. injections of saline, 3 mg/kg DL-amphetamine, 2 mg/kg diazepam, 0.2 mg/kg haloperidol or a combination of these drugs. In agreement with previous studies, amphetamine caused a significant increase in the number of USV calls and a significant increase in locomotor activity. The D2 dopamine receptor antagonist haloperidol blocked the effects of amphetamine on both USVs and locomotor activity. Diazepam blocked the effect of amphetamine on USV, but not on locomotor activity. These results suggest that diazepam selectively blocks the rewarding effect of amphetamines without affecting the psychostimulant effect of this drug. This finding is promising the context of treatment of substance use disorders and to evaluate the impact of benzodiazepines on motivation.

**Key words:** diazepam, amphetamine, dopamine, addiction, drugs of abuse, psychostimulants.

## 1. INTRODUCTION

Psychostimulants such as amphetamines are among the most widely abused drugs. According to the 2016 report from the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), in 2013 nearly 38 million people worldwide were users of amphetamines.

There is a causal link between the addictive effect of most drugs of abuse and the activation of the so-called mesolimbic dopamine reward circuitry, which is formed by dopaminergic neurons of the ventral tegmental area (VTA) projecting to the nucleus accumbens (NAc) (Dichiara and Imperato, 1988; Ikemoto, 2007; Volkow et al., 2016). Amphetamines act directly on this pathway by inhibiting dopamine reuptake and increasing dopamine release (Easton et al., 2007; Fleckenstein et al., 2007). Therefore, the acute effects of amphetamines on behavior (e.g. psychomotor agitation, hallucinations) and the reinforcing effects of amphetamines are blocked by D2 dopaminergic receptor antagonists such as the typical antipsychotic haloperidol (Angrist et al., 1974; Mackey and Vanderkogy, 1985).

Benzodiazepines are a class of drugs widely used in the treatment of acute anxiety, generalized anxiety disorder, insomnia, epilepsy, alcohol withdrawal syndrome, and in endoscopy procedures (Rudolph and Knoflach, 2011). The chronic use of benzodiazepines can also lead to addiction (Woods et al., 1992). However, in opposition to most addictive drugs, most microdialysis studies have shown that the acute administration of the benzodiazepine receptor agonist diazepam reduces dopamine release in the NAc (Finlay et al., 1992; Gomes-A et al., 2017 ; Murai et al., 1994; Yoshida et al., 1999; Zetterstrom and Fillenz, 1990). In addition, a recent electrochemical study from our group showed that diazepam blocks the effect of amphetamine to increase phasic dopamine release in the NAc of mice (Gomez-A et al., 2017). This finding makes the GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor an interesting target for treatment of abusive use of psychostimulants. Consistent with this proposal, it has been shown that diazepam and other benzodiazepines decrease self-administration of methamphetamine (Spence et al., 2016) and cocaine in rats (Goeders et al., 1997; Straub et al., 2010) and humans (Kablinger et al., 2012; Rush et al 2004).



It is possible that diazepam has anti-addictive properties because it blocks the dopamine-mediated rewarding effect of the addictive drugs. This hypothesis is supported by the finding that diazepam prevents conditioned place preference induced by amphetamine and cocaine (Meririnne et al., 1999). Another behavioral response to rewarding events in rats is the emission of high frequency ultrasonic vocalization (USV) calls (Brudzynski, 2013; Burgdorf et al., 2008; Rippberger et al., 2015). Such USV calls have been observed after systemic administration of dopaminergic psychostimulants such as amphetamine (Ahrens et al., 2013; Natusch and Schwarting, 2010; Pereira et al., 2014; Wright et al., 2013) and cocaine (Barker et al., 2010; Burgdorf et al., 2001; Mu et al., 2009; Williams and Undieh, 2010; Wintink and Brudzynski, 2001). An increase in the number of 50 kHz USV calls has also been observed during self-administration of amphetamine (Barker et al., 2014) and cocaine (Maier et al., 2012). 50 kHz USVs are also emitted in other rewarding situations (or their expectation), such as food, sex, heterospecific play, "tickling" by a human hand, and social encounters with conspecifics (Brenes and Schwarting, 2014; Brudzynski, 2013; Burgdorf et al., 2008; Rippberger et al., 2015). These findings suggest that 50 kHz USV can be used as a measure of the incentive or rewarding effects of drugs of abuse.

Previous studies have shown a reduction of spontaneous 50 kHz USVs after administration of diazepam and other benzodiazepines such as chlordiazepoxide, alprazolam, zolpidem and oxazepam; this effect was reversed by the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil (Hodgson et al., 2008; Olivier et al., 1998; Rowlett et al., 2001; Schwarting and Wöhr, 2012). However, to the best of our knowledge no previous study has tested whether the effect of psychostimulants on rat high frequency USV is blocked by benzodiazepines. Testing whether diazepam can block the effect of amphetamine on 50-kHz calls is the main goal of the present study. In addition, we tested whether diazepam can also block the increase in locomotor activity induced by amphetamine.

## 2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 2.1. ANIMALS

Data of 60 adult male Wistar rats (220–330 g) were included in this study. Data of other 6 rats were excluded because they did not achieved the vocalization criterion in a screening session (see below). Rats were housed in groups of five in polypropylene cages (41 cm × 34 cm × 16 cm) with sawdust bedding under a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and a controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C). Food and water were available *ad libitum*. Behavioral tests started 1 week after the arrival of the animals in the vivarium and were carried out in the afternoons, after 1 h of habituation in the testing room. All experiments were performed in accordance with the Brazilian (11.794/8 bill from October 2008) and international (86/609/EEC) laws and the Animal Experimental Ethics and Care and the National Institutes of Health Guide. The experimental protocol was approved by the Institutional Ethical Board (CEUA-UFPR: protocol #1004). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

### 2.2. DRUGS AND TESTING GROUPS

All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), except for haloperidol (Cristália, Curitiba, Brazil). They were dissolved in 0.9% NaCl saline (SAL), and injected i.p. in the following doses: DL-amphetamine sulfate (AMP), 3 mg/kg; diazepam (DZP), 2 mg/kg; haloperidol (HALO), 0.2 mg/kg. Rats were randomly assigned to the following groups: SAL/SAL; AMP/SAL; SAL/DZP; SAL/HALO; AMP/DZP; AMP/HALO; N=10 rats/group. No interval was given between the two drug injections.

### 2.3. USV RECORDING

Each rat was gently placed onto the center of an activity box (see dimensions below) and USV calls were recorded in 2 sessions of 5 min, 24 h apart. The 6 rats that did not vocalize in the first session were excluded from the experiment. Drug treatment (see above) was given 30 min before the second

session. USVs were monitored by a microphone (UltraSoundGate Condenser Microphone, CM16; Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) placed centrally and 45 cm above the floor of the box. The microphone was connected to a computer controlled by the Avisoft Recorder 2.7 software. The USV calls were analyzed by the software SAS Lab Pro (Avisoft Bioacoustics) and 50-kHz USV were counted manually and off-line from the spectrograms. If two call elements were at least 0.048 s apart, two independent calls were counted. All USV emitted over 33 kHz were considered as 50-kHz USV (Wöhr et al., 2008).

## 2.4. LOCOMOTOR ACTIVITY

Locomotor activity was tested in the activity box during the USV test session (see above). Rat behavior was recorded by video for 5 min in an acrylic box (40x40x40 cm) with the floor covered with sawdust bedding, of the same kind used in the home cage. The bedding was changed between subjects. The number of times were scored, each rat crossed the lines that divided the image of the box into 9 squares.

## 2.5 DATA ANALYSIS

USV and locomotor activity data did not fulfill the criterion for normality. However, when these data were transformed with the algorithm [ $Y = \sqrt{Y}$ ], all data passed the Shapiro-Wilk normality test and the Bartlett's test for equal variances. Therefore, we used the transformed data to run two-way ANOVAs followed by the Newman-Keuls post-hoc tests by using the GraphPad Prism software. The data shown in the graphics and tables are the mean  $\pm$  SEM of the raw data. Differences among groups were considered significant when  $p < 0.05$ .

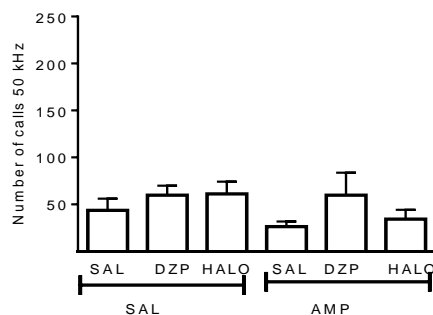
### 3 RESULTS

Two-way ANOVA statistics are shown in Table 1 and the post hoc Newman Keuls tests are shown in the figure and table legends.

#### 3.1 ULTRASONIC VOCALIZATION

The total number of USV calls data are shown in Figure 1. Before drug treatment (Day 1, Figure 1A) no significant difference among groups in number of 50 kHz USV calls was observed. On day 2 (Figure 1B), the treatment with amphetamine caused a significant increase in the number of USV calls compared to the SAL group. The treatments with diazepam or haloperidol did not significantly alter the number of USV calls, compared to the SAL group. The amphetamine effect was blocked by co-administration of both diazepam and haloperidol (HALO): the number of USV calls of the groups AMP/DZP and AMP/HALO were significantly lower compared to the AMP/SAL group; no significant difference was observed between the number of USV calls of the groups AMP/DZP and AMP/HALO compared to the SAL/SAL group.

A) Day 1: before drug treatment



B) Day 2: after drug treatment

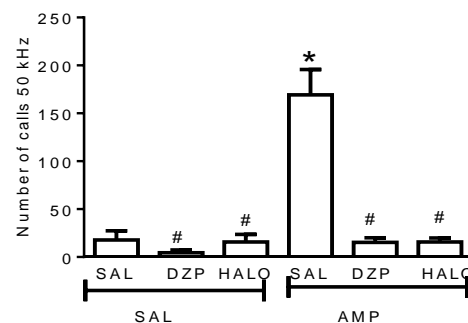


Figure 1: Diazepam and haloperidol blocked the increase in the number of 50 kHz USV induced by amphetamine. SAL, saline; AMP, 3mg/kg amphetamine, DZP, 2 mg/kg diazepam, HALO, 0.2 mg/kg haloperidol. A and B data are shown as mean  $\pm$  SEM. N = 10 rats/group. \*  $p < 0.05$  compared to SAL/SAL group; #  $p < 0.05$  compared to AMP/SAL group; Newman-Keuls test after 2 way ANOVA.

Individual representative examples of the different types of 50 Hz USV calls registered are shown in Figure 2.

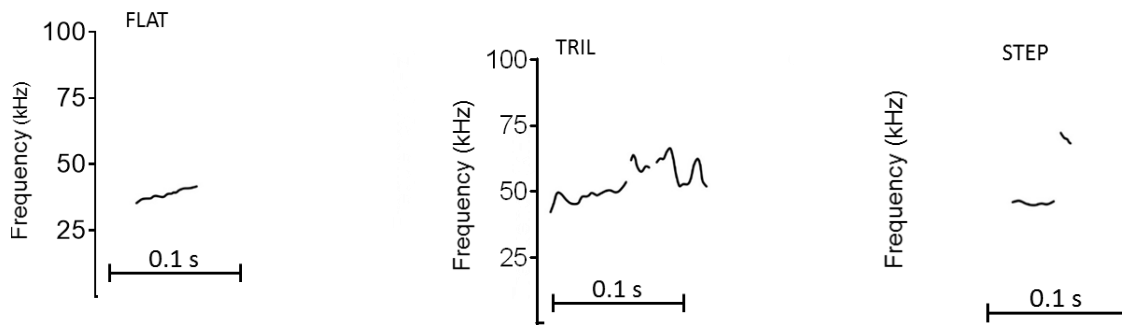


Figure 2. Representative examples of USV call types.

The effects of the drug treatments on the numbers of flat USV calls are shown in Figure 3A. On day 2, the treatment with amphetamine caused a significant increase in the number of flat USV calls compared to the SAL group. The treatments with diazepam or haloperidol did not significantly alter the number of flat USV calls compared to the SAL group. The amphetamine effect was blocked by co-administration of both diazepam and haloperidol: the number of flat USV calls of the groups AMP/DZP and AMP/HALO were significantly lower compared to the AMP/SAL group; no significant difference was observed between the number of flat USV calls of the groups AMP/DZP and AMP/HALO compared to the SAL/SAL group.

The effects of the drug treatments on the numbers of trill USV calls are shown in Figure 3B. On day 2, the treatment with amphetamine caused a significant increase in the number of trill USV calls compared to the SAL group. The treatments with diazepam or haloperidol did not significantly alter the number of trill USV calls compared to the SAL group. The amphetamine effect was blocked by co-administration of both diazepam and haloperidol: the number of trill USV calls of the groups AMP/DZP and AMP/HALO were significantly lower compared to the SAL/AMP group; no significant difference was observed between the number of trill USV calls of the groups AMP/DZP and AMP/HALO compared to the SAL/SAL group.

As shown in Figure 3C and Table 1, no significant difference in the numbers of step USV calls effect was observed among groups.

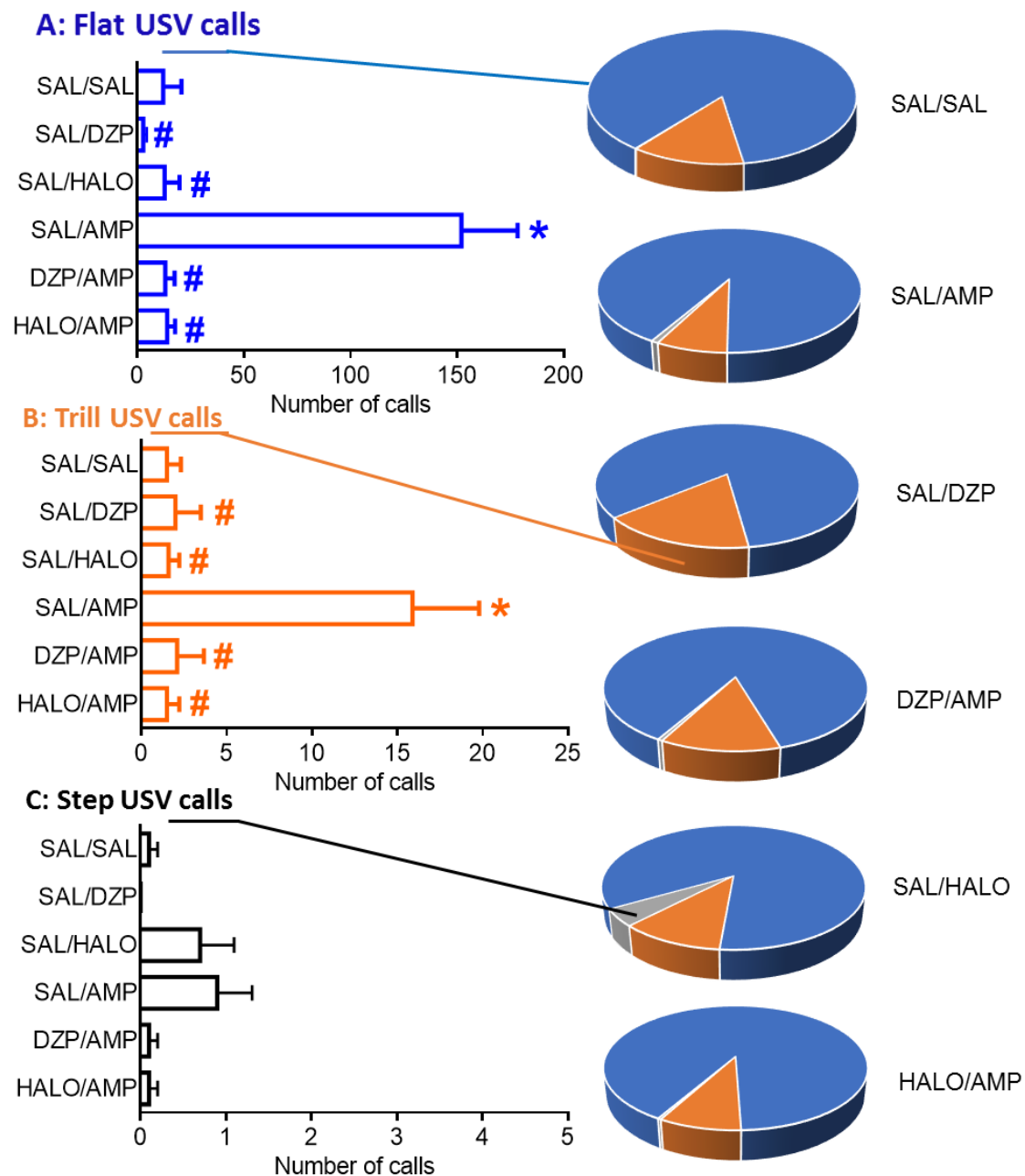


Figure 3. Effects of amphetamine, diazepam and haloperidol on flat- (blue), trill- (orange), and step- (grey) type of USVs. Bar graphics express the as mean  $\pm$  SEM numbers of flat, trill and step USV types; Pizza graphics express the mean percent of each type of USV call. N = 10 rats/group. SAL, saline; ANF, 3mg/kg amphetamine, DZP, 2 mg/kg diazepam, HALO, 0.2 mg/kg haloperidol. \*  $p < 0.05$  compared to SAL/SAL group; #  $p < 0.05$ , compared to SAL/AMP group; Newman-Keuls test after 2 way ANOVA.

Table 1: Two-way ANOVA statistics

Parameters	Treatment 1 (SAL,DZP,HAL O)		Treatment 2 (SAL,AMP)		Interaction	
	F(1,5 2)	p	F(2,5 2)	p	F(2,52)	P
Total number of calls (day 1)	3.24	0.08	1.92	0.15	0.29	0.74
Total number of calls (day 2)	39.6	<b>0.01</b>	30.4	<b>0.01</b>	18.9	<b>0.01</b>
Number of flat-type calls (day 2)	45.0	<b>0.01</b>	27.5	<b>0.01</b>	19.1	<b>0.01</b>
Number of trill-type calls (day 2)	6.87	<b>0.01</b>	5.75	<b>0.01</b>	7.11	<b>0.01</b>
Number of step-type calls(day2)	0.25	0.62	2.13	0.13	4.20	<b>0.02</b>
Latency	4.13	<b>0.04</b>	5.96	<b>0.01</b>	2.16	0.13
Total call time	34.0	<b>0.01</b>	37.0	<b>0.01</b>	15.4	<b>0.01</b>
Meancallduration	2.15	0.15	2.67	0.08	0.41	0.66
Peakfrequency	2.21	0.14	0.48	0.62	0.84	0.44
Band width	5.00	<b>0.03</b>	0.11	0.89	0.15	0.86
Frequency modulation	8.69	0.99	0.17	0.84	0.23	0.79
Locomotor activity	172	<b>0.001</b>	72	<b>0.001</b>	7.05	<b>0.001</b>

SAL, saline; AMP, 3mg/kg amphetamine, DZP, 2 mg/kg diazepam, HALO, 0.2 mg/kg haloperidol

Table 2: Effects of amphetamine, diazepam and haloperidol in the behavioral and acoustic parameters of the USV calls.

	SAL/SAL	SAL/DZP	SAL/HALO	AMP/SAL	AMP/DZP	AMP/HALO
Total call time(s)	0.65±0.31	0.12±0.08 <sup>#</sup>	0.32±0.18 <sup>#</sup>	4.75±0.75 <sup>*</sup>	0.37±0.13 <sup>#</sup>	0.35±0.10 <sup>#</sup>
Latency (s)	8.42 ±4.44	16.95±9.92	16.66±7.58	4.26 ±2.12	52.74±17.72 <sup>* # \$</sup>	29.08±8.91
Mean call duration(ms)	20.8±0.003	16.0±0.004	17.0±0.001	28.0±0.001	17.0±0.003	21.0±0.001
Frequency peak (kHz)	53.10±4.07	59.21±2.24	55.23±2.90	59.29±1.09	58.40±2.22	59.63±2.01
Band width (kHz)	20.22±3.73	21.95±5.51	19.62±5.80	13.26±2.30	12.37±4.15	13.75±4.16
Frequency modulation (kHz)	47.94±4.29	44.66±4.43	46.59±3.48	44.89±2.36	45.65±3.82	48.01±2.60

---

SAL, saline; AMP, 3mg/kg amphetamine, DZP, 2 mg/kg diazepam, HALO, 0.2 mg/kg haloperidol. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  compared to SAL/SAL group; #  $p < 0.05$  compared to SAL/AMP group; \$  $p < 0.05$  compared to SAL/HALO group; Newman Keuls test after 2 way ANOVA.

As shown in Tables 1 and 2, the drug treatments caused few significant alterations in the behavioral and acoustic properties of the recorded 50 Hz USV calls. The effects of the drug treatments on the total call time were similar to the effects of these treatment on the total number of calls: the treatment with amphetamine caused a significant increase in the total call time compared to the SAL group. The treatments with diazepam or haloperidol did not significantly alter the total call time compared to the SAL group. The amphetamine effect was blocked by co-administration of both diazepam and haloperidol: the total call time of the groups AMP/DZP and AMP/HALO were significantly lower compared to the SAL/AMP group; no significant difference was observed between the total call time of the groups AMP/DZP and AMP/HALO compared to the SAL/SAL group. On the other hand, only the AMP/DZP presented significantly longer latency for the first call compared with the SAL/SAL, AMP/SAL, and SAL/HALO groups. No significant difference was observed between the AMP/DZP and SAL/DZP groups. No significant differences among groups was observed for mean call duration, frequency peak, band width, and frequency modulation parameters.

### 3.2 LOCOMOTOR ACTIVITY

The effects of the drug treatments on locomotor activity are shown in Figure 4 and Table 1. The treatment with amphetamine caused a significant increase and the treatment with haloperidol caused a significant decrease in the number of crossings compared to the SAL group. On the other hand, no significant difference was observed between the number of crossings of the SAL and DZP groups. When haloperidol and amphetamine were co-administered at the same time, they reciprocally blocked the each other effects: the number of crossings AMP/HALO group was not significantly different of the



SAL/SAL group and the number of crossings AMP/HALO group was significantly lower compared to the AMP/SAL group. On the other hand, diazepam potentiated the effect of amphetamine on locomotor activity: the number of crossings of the AMP/DZP group was significantly higher compared to the SAL/SAL, SAL/DZP, and AMP/SAL groups.

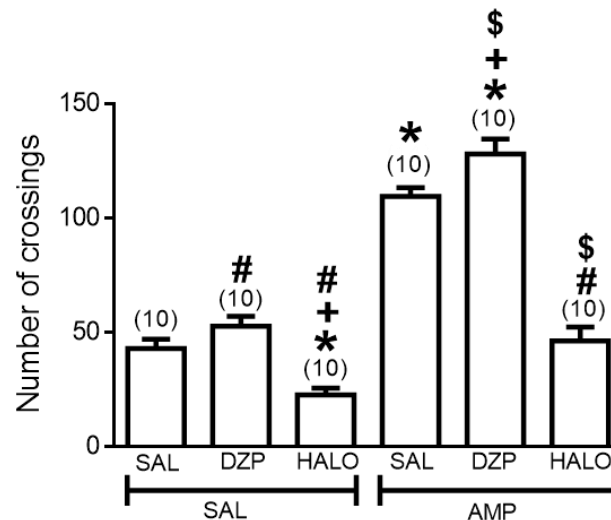


Figure 4. Diazepam did not block the increase in locomotor activity induced by amphetamine. Bars represent mean  $\pm$  SEM number of crossings in an open field. N = 10 rats/group. SAL, saline; AMP, 3mg/kg amphetamine, DZP, 2 mg/kg diazepam, HALO, 0.2 mg/kg haloperidol. \*  $p < 0.05$  compared to sal/sal group; #  $p < 0.05$  compared to AMP/SAL group; +  $p < 0.05$  compared to sal/dzp group; \$  $p < 0.05$  compared to sal/halo group. Newman-Keuls test after ANOVA.

## 4 DISCUSSION

The main results of the present study was that diazepam blocked the increase in the number and total duration of the 50 kHz USV calls induced by amphetamine, but did not block the increase in locomotor activity induced by amphetamine in adult rats. This finding supports the hypothesis that diazepam can selectively block the rewarding effect of amphetamine. Previous studies have reported that diazepam given alone reduced the number of 50 kHz USV calls in rat pups (Hodgson et al., 2008; Olivier et al., 1998; Rowlett et al., 2001;

Schwarting and Wöhr, 2012). Evidence for the hypothesis that benzodiazepines block the rewarding effects of drugs of abuse were also provided by studies that tested the effects of benzodiazepines in reward motivated tasks. These studies have shown that: (i) diazepam blocks the conditioned preference for a place previously paired with amphetamine, cocaine or the opioid kappa receptor agonist U50-488 (Leri and Franklin., 2000; Meririnne et al., 1999); (ii) diazepam and other benzodiazepines reduce self-administration of methamphetamine (Spence et al., 2016) and cocaine (Goeders et al., 1997; Straub et al, 2010) in rats; (iii) diazepam reduces self-administration of amphetamine by humans (Kablinger et al., 2012; Rush et al 2004).

There is substantial evidence that rats emit 50 kHz USV calls in rewarding situations or in expectation of them. These calls have been observed in rats exposed to pleasurable stimuli such as mating, heterospecific play, "tickling" by a human hand, and social encounters with conspecifics (Brudzynski, 2013; Burgdorf et al., 2008; Rippberger et al., 2015). Increased USV calls have also been observed after systemic administration of psychostimulants which cause release of catecholamine neurotransmitters, such as D-amphetamine (Ahrens et al, 2013; Natusch and Schwarting, 2010; Pereira et al., 2014; Wright et al., 2013) and cocaine (Barker et al, 2010; Burgdorf et al., 2001; Mu et al, 2009; Simola et al., 2012; Williams and Undieh, 2010; Wintink and Brudzynski, 2001). Rats also emit 50-kHz calls during self-administration of amphetamine (Barker et al., 2014) and cocaine (Maier et al., 2012). Another study has also shown increased 50 kHz USV calls while rats explored a place previously paired with amphetamine (Wright et al., 2010). In addition, microinjection of amphetamine into the rodent NAc has reinforcing effects and also elicits 50 kHz USV in rats (Burgdorf et al., 2001; Thompson et al., 2006). Conversely, it has been shown that intra-NAc administration of D1-like and D2-like dopamine receptor antagonists suppressed amphetamine-evoked USVs (Barker et al., 2015; Rippberger et al., 2015). Therefore, the results of the present and previous studies are consistent with the hypothesis that diazepam blocks amphetamine-induced 50 kHz USV calls because it blocks the rewarding effect of drugs of abuse.

It has been suggested that, in addition to the number of 50 kHz USV calls, its acoustic characteristics (frequency and bandwidth) encode their

affective meaning (Brudzynski, 2005). However, in the present study we did not observe changes in the peak frequency and bandwidth of USVs after treatment with amphetamine or diazepam.

In the present study, we observed an increase in flat and trill types of USVs, and these effects were blocked by both diazepam and haloperidol. These findings are in agreement with previous studies showing that amphetamine treatment increased flat and trill type USV vocalizations (Ahrens et al, 2009; Simola et al., 2012; Wright et al., 2010). However, trill vocalizations were not induced by other drugs of abuse such as MDMA, nicotine and caffeine (Mu et al., 2009; Sadananda et al., 2012; Simola et al., 2010; Simola et al., 2012; Simola et al., 2014; Williams and Undieh, 2010). Nevertheless, Burgdorf et al. (2008) showed a positive correlation between trill and step type USV and the appetitive valence of mating situations, jokes, tickling, pairing with a co-specific and aggression. The current finding that the effect diazepam blocked the effect of dopamine on the increase of trill type 50 Hz USV calls without affecting locomotion supports assumption that 50-kHz calls are not a mere correlate of behavioral activation and seem to depend on at least partly different neural mechanisms (as discussed in Natusch & Schwarting and Schwarting et al. 2007).

The release of dopamine in the NAc is one of the main mechanisms of the addictive effect of most drugs of abuse (Wise and Rompre, 1989). Most drugs of abuse cause an increase in dopamine release in NAc (Imperato and Di Chiara 1986). The levels of dopamine in the NAc of rats increase when they are placed in an environment previously paired with drugs of abuse like amphetamine and cocaine (Meririnne, 1999; Mithani et al., 1986). In the present study, we observed that not only diazepam but also haloperidol, a dopaminergic antagonist that acts mainly on D2-like receptors (Rippberger et al., 2015), blocked the increase of amphetamine-elicited USVs. Other studies have also shown a reduction in the number and qualitative changes of USVs in rats treated with haloperidol (Ciucci et al., 2007; Rippberger et al., 2015; Wright et al., 2013) and in rats with unilateral striatal dopamine depletion (Ciucci et al., 2007). Other D1-like and D2-like dopamine receptor antagonists such as SCH 23390 and SCH 39166, clozapine, risperidone, raclopride and pimozide also block the increase of amphetamine-induced USV (Brudzynski, 2015; Ringel et

al., 2013; Rippberger et al., 2015). This suggests that the effect of diazepam on amphetamine-induced USV calls is mediated by the mesolimbic dopamine reward system.

Amphetamine promotes an increase in the extracellular concentration of dopamine and other monoamines by various mechanisms. It acts by blocking the dopamine transporter (DAT), the noradrenaline transporter (NET) and, to a smaller degree, also blocks the serotonin transporter (SERT). After being transported into the presynaptic terminals, amphetamine also inhibits the vesicular monoamine transporter type 2 (VMAT2) and promotes the release of monoamines into the synaptic cleft (Robertson et al., 2009).

The findings of the present study are not coherent with electrophysiology studies reported that another benzodiazepine (midazolam) increased the firing of VTA neurons in freely moving mice (O'Brien and White, 1987; Tan et al., 2010). A caveat of these studies is that the neurons were identified as dopaminergic based only in electrophysiological criteria. On the other hand the findings of the present study are in agreement with microdialysis studies that have consistently shown that while drugs of abuse such as cocaine, amphetamines and opioids increase dopamine release in NAc, (Clark et al., 2010; Flagel et al., 2011; Koob and Volkow, 2010; Willuhn et al., 2012), benzodiazepines do the opposite, that is, decrease accumbal dopamine concentration (Finlay et al., 1992; Gomes-A et al., 2017; Murai et al., 1994; Yoshida et al., 1999; Zetterstrom and Fillenz, 1990). In a recent voltammetry study, we have shown that systemic administration of diazepam blocks the effect of amphetamine on dopamine release in the NAc of anesthetized mice (Gomez-A et al., 2017). Together, these studies present more stronger evidence that that diazepam blocks the rewarding effects of amphetamine by preventing the release of dopamine in the NAc. This makes the GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor an interesting target for the treatment of abusive use of psychostimulants and other drugs of abuse.

## **Acknowledgements**

CNPq, CAPES and UFPR

DFG: SCHW 559/14-1.

## 5 REFERENCES

Ahrens, A.M., Nobile C.W., Page L.E., Maier, E.Y., Duvauchelle, C.L., Schallert, T., 2013. Individual differences in the conditioned and unconditioned rat 50-kHz ultrasonic vocalizations elicited by repeated amphetamine exposure. *Psychopharmacology* 229, 687–700.

Ahrens, A.M., Ma, S.T., Maier, E.Y., Duvauchelle, C.L., Schallert, T., 2009. Repeated intravenous amphetamine exposure: rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. *Behavior Brain Res.* 197, 205-209.

Angrist, B., Lee, H.K., Gershon, S., 1974. Antagonism of amphetamine-induced symptomatology by a neuroleptic. *Am. J. Psychiat.*, 131, 817-819.

Barker, D.J., Root, D.H., Ma, S., Jha, S., Megehee, L., Pawlak, A.P., West, M.O., 2010. Dose-dependent differences in short ultrasonic vocalizations emitted by rats during cocaine self-administration. *Psychopharmacology* 211, 435– 442.

Barker, D.J., Simmons, S.J., West, M.O. Ultrasonic vocalizations as a measure of affect in preclinical models of drug abuse: A review of current findings. *Curr. Neuropharmacology*, 2015, 13, 193-210.

Barker, D.J., Simmons, S.J., Servilio, L.C., Bercovicz, D., Ma, S., Root, D.H., Pawlak, A.P., West, M.O., 2014. Ultrasonic vocalizations: evidence for an affective opponent process during cocaine self administration. *Psychopharmacology* 231, 909-918.

Brenes, J., Schwarting, R.K.W., 2014. Attribution and expression of incentive salience are differentially signaled by ultrasonic vocalizations in rats. *PLOS One* 7: e102414.

Brudzynski, S.M., 2015. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Current Neuropharmacology* 13, 180-192.

Brudzynski, S.M., 2013. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 310-317.

Brudzynski, S.M., 2005. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behavior Genet.* 35, 85-92.

Burgdorf, J., Knutson, B., Panksepp, J., Ikemoto, S., 2001. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behavior Neurosci.* 115, 940-944.

Burgdorf, J., Kroes, R.A., Moskal, J.R., Pfaus, J.G., Brudzynski, S.M., Panksepp, J., 2008. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during

mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J. Comp. Psychol.* 122, 357-367.

Ciucci, M.R., Ma, S.T., Fox, C., Kane, J.R., Ramig, L.O., Schallert, T., 2007. Qualitative changes in ultrasonic vocalization in rats after unilateral dopamine depletion or haloperidol: a preliminary study. *Behavior Brain Res.* 182, 284-289.

Clark, J.J., Sandberg, S.G., Wanat, M.J., Gan, J.O., Horne, E.A., Hart, A.S., Akers, C.A., Parker, J.G., Willuhn, I., Martinez, V., Evans, S.B., Stella, N., Phillips, P.E., 2010. Chronic microensors for longitudinal, subsecond dopamine detection in behaving animals. *Nat Methods* 7, 126–129.

Di Chiara, G., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5274-5278.

Easton, N., Steward, C., Marshall, F., Fone, K., Marsden, C., 2007. Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. *Neuropharmacology* 52, 405-414

Finlay, J.M., Damsma, G., Fibiger, H.C., 1992. Benzodiazepine-induced decreases in extracellular concentrations of dopamine in the nucleus-accumbens after acute and repeated administration. *Psychopharmacology* 106, 202-208.

Flagel, S.B., Clark, J.J., Robinson, T.E., Mayo, L., Czuj, A., Willuhn, I., Akers, C.A., Clinton, S.M., Phillips, P.E., Akil, H., 2011. A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. *Nature* 469, 53–57.

Fleckenstein, A.E., Volz, T.J., Riddle, E.L., Gibb, J.W., Hanson, G.R., 2007. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47, 681–698.

Goeders, N.E., 1997. A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology*, 22, 237-259.

Gomez-A, A., Fiorenza, A.M., Boschen, S.L., Sugi, A.H., Beckman, D., Ferreira S.T., Lee, K., Blaha, C.H., Da Cunha, C., 2017. Diazepam Inhibits Electrically Evoked and Tonic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens and Reverses the Effect of Amphetamine. *ACS Chemical Neuroscience* 8, 300-309.

Hodgson, R.A., Guthrie, D.H., Varty, G.B., 2008. Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure: sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacology. Biochem. Behavior* 88, 341-348.

Ikemoto, S., 2007. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* 56, 27-78.

Imperato, A., Di Chiara, G., 1986. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 239, 219–228.

Kablinger, A.S., Lindner, M.A., Casso, S., Hefti, F., DeMuth, G., Fox, B.S., McNair, L.A., McCarthy, B.G., Goeders, N.E., 2012. Effects of the combination of metyrapone and oxazepam on cocaine craving and cocaine taking: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *Journal of Psychopharmacology* 26, 973-981.

Koob, G.F., Volkow, N.D. 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217–238.

Leri, F., Franklin K.B., 2000. Effects of diazepam on conditioned place preference induced by morphine or amphetamine in the rat. *Psychopharmacology* 150, 351-360.

Mackey, W.B., Vanderkooy, D., 1985. Neuroleptics block the positive reinforcing effects of amphetamine but not of morphine as measured by place conditioning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 22, 101-105.

Maier, E.Y., Abdalla, M., Ahrens, A.M., Schallert, T., Duvauchelle, C.L. , 2012. The missing variable: ultrasonic vocalizations reveal hidden sensitization and tolerance-like effects during long-term cocaine administration. *Psychopharmacology* 219, 1141-1152.

Meririnne, E., Kankaanpää, A., Lillsunde, P., Seppala, T., 1999. The effects of diazepam and zolpidem on cocaine- and amphetamine-induced place preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 62, 159–164.

Mithani, S., Martin-Iverson, M.T, Phillips, A.G, Fibiger, H.C., 1986. The effects of haloperidol on amphetamine- and methylphenidate-induced conditioned place preferences and locomotor activity. *Psychopharmacology* 90, 247–252.

Mu, P., Fuchs, T., Saal, D.B., Sorg, B.A., Dong, Y., Panksepp, J., 2009. Repeated cocaine exposure induces sensitization of ultrasonic vocalization in rats. *Neurosci. Lett.* 453, 31-35.

Murai, T., Koshikawa, N., Kanayama, T., Takada, K., Tomiyama, K., Kobayashi, M., 1994. Local-administration of flurazepam has different effects on dopamine release in striatum and nucleus accumbens - a microdialysis study. *Eur. J. Pharmacology* 261, 65-71.

Natush, C., Schwarting, R.K.W., 2010. Using bedding in a test environment critically affects 50kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacology Biochem Behavior* 96, 251-259.

O'Brien, D. P., and White, F. J. (1987) Inhibition of non-dopamine cells in the ventral tegmental area by benzodiazepines - relationship to A10 dopamine cell-activity. *European Journal of Pharmacology* 142, 343-354.

Olivier, B., Molewijk, E., van Oorschot, R., van der Heyden, J., Ronken, E., Mos, J., 1998. Rat pup ultrasonic vocalization: effects of benzodiazepine receptor ligands. *Eur. J. Pharmacology* 358, 117-128.

Pereira, M., Andreatini, R., Schwarting, R.K., Brenes, J.C., 2014. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? *Psychopharmacology* 231, 2567-2577.

Ringel, L.E., Basken, J.N., Grant, L.M., Ciucci, M.R., 2013. Dopamine D1 and D2 receptor antagonism effects on rat ultrasonic vocalizations. *Behavior Brain Res.* 252-259.

Rippberger, H., van Gaalen M.M., Schwarting R.K.W., Wöhr, M., 2015. Environmental and pharmacological modulation of amphetamine induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Curr. Neuropharmacology* 13, 220-232.

Robertson, S. D., Matthies, H. J. G., Galli, A., 2009. A Closer Look at Amphetamine-Induced Reverse Transport and Trafficking of the Dopamine and Norepinephrine Transporters. *Mol. Neurobiol.* 39, 73-80.

Rowlett, J.K., Tornatzky, W., Cook, J.M., Ma, C., Miczek, K.A., 2001. Zolpidem, triazolam, and diazepam decrease distress vocalizations in mouse pups: differential antagonism by flumazenil and betaCarboline-3-carboxylate-t-butyl ester (beta-CCt). *J. Pharmacology. Exp. Ther.* 297, 247-253.

Rudolph, U., Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA(A) receptor subtypes. *Nature Rev. Drug Discovery* 10, 685-697.

Rush, C.R., Stoops, W.W., Wagner, F.P., Hays, L.R., Glaser, P.E.A., 2004. Alprazolam attenuates the behavioral effects of D-amphetamine in humans. *J. Clin. Psychopharmacology* 24, 410-420.

Sadananda, M., Natusch, C., Karrenbauer, B., Schwarting, R.K., 2012. 50-kHz calls in rats: effects of MDMA and the 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacology Biochem. Behavior* 101, 258-264.

Schwarting, R.K., Wöhr, M., 2012. On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 337-348.

Schwarting, R.K.W., Jegan, N., Wöhr, M., 2007. Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behavioural Brain Research* 182, 208-222.



Schwarting, R. K. W., Natusch, C., Llano, L., Bedenk, B., Borchers, M., and Wohr, M. (2007) 50-kHz ultrasonic calling in male rats: Environmental, social and subjective factors. *Behavioural Pharmacology* 18, S66-S67.

Simola, N., Fenu, S., Costa, G., Pinna, A., Plumitallo, A., Morelli, M., 2012. Pharmacological characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: comparison of the effects of different psychoactive drugs and relevance in drug-induced reward. *Neuropharmacology* 63, 224-234.

Simola, N., Frau, L., Plumitallo, A., Morelli, M., 2014. Direct and long lasting effects elicited by repeated drug administration on 50-kHz ultrasonic vocalizations are regulated differently: implications for the study of the affective properties of drugs of abuse. *Int. J. Neuropsychopharmacology* 17, 429-441.

Simola, N., Ma, S.T., Schallert, T., 2010. Influence of acute caffeine on 50-kHz ultrasonic vocalizations in male adult rats and relevance to caffeine-mediated psychopharmacological effects. *Int. J. Neuropsychopharmacology* 13, 123-132.

Spence, A.L., Guerin, G.F., Goeders, N.E., 2016. The differential effects of alprazolam and oxazepam on methamphetamine self-administration in rats. *Drug and Alcohol Dependence* 166, 209-217.

Straub, C.J., Carlezon, W.A.Jr., Rudolph, U., 2010. Diazepam and cocaine potentiate brain stimulation reward in C57BL/ 6J mice. *Behavior Brain Res.* 206, 17-20.

Thompson, B., Leonard, K.C., Brudzynski, S.M., 2006. Amphetamine induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behavior Brain Res.* 168, 64-73.

Tan, K. R., Brown, M., Labouebe, G., Yvon, C., Creton, C., Fritschy, J. M., Rudolph, U., and Luscher, C. (2010) Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature* 463, 769-U78.

UNODC – Disponível em: <https://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/index.html>. Acesso em 15 fev. 2017.

Volkow, N.D., Koob, G.F., McLellan, A.T., 2016. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N. Engl. J. Med.* 374, 363-371.

Williams, S.N., Undieh, A.S. 2010. Brain-derived neurotrophic factor signaling modulates cocaine induction of reward-associated ultrasonic vocalization in rats. *J. Pharmacology Exp. Ther.* 332, 463-468.

Willuhn, I., Burgeno, L.M., Everitt, B.J., Phillips, P.E., 2012. Hierarchical recruitment of phasic dopamine signaling in the striatum during the progression of cocaine use. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 20703–20708.

Wintink, A.J., Brudzynski, S.M., 2001. The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. *Pharmacology Biochem. Behavior* 70, 317-323.

Wise, R.A., Rompre, P.P., 1989. Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology* 40, 191–225

Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R.K., Spruijt, B., 2008. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology Behavior* 93, 766–776.

Woods, J.H., Katz, J.L., Winger, G., 1992. Benzodiazepines - use, abuse, and consequences. *Pharmacology Rev.* 44, 151-347.

Wright, J.M., Dobosiewicz, M.R., Clarke, P.B., 2013. The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in amphetamine induced rat ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology* 225, 853– 868.

Wright, J.M., Gourdon, J.C., Clarke, P.B., 2010. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology*, 1-13.

Yoshida, Y., Koide, S., Hirose, N., Takada, K., Saigusa, T., Koshikawa, N., 1999. In vivo microdialysis evidence that midazolam facilitates propofol-induced reduction in rat accumbal dopamine release. *Neurosci. Res. Commun.* 25, 121-127.

Zetterstrom, T., Fillenz, M., 1990. Local-administration of flurazepam has different effects on dopamine release in striatum and nucleus accumbens - a microdialysis study. *Neuropharmacology* 29, 129-134.